

SILVANA MARIA ALBAN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE HANSENOMAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas oportunidades, por ter-me permitido chegar até aqui e pela certeza de Sua presença ao longo desta caminhada.

A meus pais, Selvino Alban e Neiva Fedatto Alban e a minha irmã Sandra Maria Alban, pelo amor, compreensão e por compartilhar momentos de cansaço e preocupações, sempre me incentivando a prosseguir.

À professora Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, primeiramente, por ter-me aceito como orientada, e ao longo deste tempo, espero ter merecido sua confiança. Agradeço pelos ensinamentos, atenção, infinita paciência, dedicação e incentivo a não esmorecer.

Ao professor Dr. Marcelo Távora Mira, pela atenção dedicada desde que fomos-nos apresentados. Agradeço pela receptividade, dicas e contribuições certamente importantes.

À Sandra R. B. R. Sella, pela oportunidade de conhecê-la, pela confiança em mim depositada na realização do estágio curricular no CPPI e por conduzir-me no caminho da pesquisa. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela generosidade, amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Sr. Rubens L. F. Gusso, diretor do CPPI, pela oportunidade do estágio curricular, pela disponibilização dos laboratórios, materiais, insumos e equipamentos imprescindíveis na realização deste trabalho.

À Regina E. F. Dlugokenski, Wilma R. Guerra, Neide F. B. Binder, Regiane A. Szargiki, João Carlos Minozzo, Júlia S. Camillo, Isolete P. da Silva e Rosana Z. Guimarães, pela atenção, colaboração e ensinamentos. À Elza R. Mendes, Neuza de Araújo, Sonilda S. dos Santos, Shirley M. dos Santos, Eva Braz, Milena S. G. da Silva, Rosângela P. de Lara, Rosângela S. de L. Paula e Margarete P. Machado pela disposição em ajudar-me. À Adalgisa L. Braga, Maria Inês de P. Corrêa, Nadir Laidane Filho, Rubemyr M. S. Chaiben, Rubens G. de Souza, Isabel C. da Silva, Maria José Passos, Dóris do C. Baungart, Lilian C. Dornelles, Paulo da R. L. Pacheco, João A. da Cruz, Antonio Silvério Oliveira e Jacques B. da Silva por auxiliar-me em questões administrativas e rotineiras. Enfim, agradeço a todos do CPPI, inclusive àqueles que não citei, pela satisfação em conhecê-los, pela amizade

e pela convivência ao longo destes anos. Espero, sinceramente, poder estarmos juntos por mais tempo.

À Fundação Pró-Hansen, especialmente professor Dr. Ruy N. Miranda, exemplo de dedicação, à Ivone T. Dechamdt e Arnaldo Tod, pela participação em introduzir-me no caminho da pesquisa e pela disponibilidade em ajudar com amostras e informações.

Ao Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, especialmente aos médicos Dr. Hamilton L. Rebeiro e Dr. José M. Lanzoni, as enfermeiras Jussara de Carvalho, Maria Bernadete G. de Lima e Cristina M. Umezawa, à Anadir M. Daris, auxiliar de enfermagem, e ao farmacêutico bioquímico Rene A. Penno pela prontidão, receptividade e pela colaboração com amostras e informações.

À Nivera N. Stremel, coordenadora estadual do programa de Eliminação de Hanseníase da Secretária Estadual de Saúde, pela atenção, contribuições e pelos convites às oficinas. Aos profissionais das regionais de saúde do Paraná e dos centros de referência dos demais estados do Brasil, não citarei nomes, pois, são muitos, pela atenção em atender-me, pelas informações e pelo auxílio quando possível.

Aos professores do programa de pós-graduação em Processos Biotecnológicos, com o coordenador professor Dr. Carlos R. Soccol e vice-coordenadora professora Dr^a. Luciana P. de Souza Vandenberghe, pelos conhecimentos transmitidos.

Às professoras do Departamento de Patologia Básica, do laboratório de Parasitologia Molecular, Dr^a. Edilene A. de Castro e Dr^a. Rosângela C. Paulino pela cooperação.

À Giovanna B. M. Lucas, Andréa Boçois e Thiago O. Agostino da Biblioteca de Ciências e Tecnologia pelos serviços bibliotecários.

Aos colegas de pós-graduação e de laboratório, especialmente Michele R. Spier, Katherine A. T. de Carvalho, Nelson L. M. Fernandes, Samira C. Ehlers, Cristina S. Sotomaior, Paôla W. Meireles, Ellen de S. Marquez, Silvia C. Osaki, Yanê de Carvalho, Marcelo Malaghini, Soraia R. Gilber, Luciane M. Henning, Juliana T. Pereira, Viviane Milczewsk, Tatiana

Gazda e Diego Canloffski, seja pelo auxílio ou seja pelo companheirismo e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, sou grata a todos aqueles, que gentilmente contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 MICOBACTÉRIAS	4
3.1.1 Características Gerais	4
3.1.2 Classificação das Micobactérias	5
3.1.3 Biossegurança	7
3.1.4 Colheita e Processamento de Amostras	7
3.1.5 Digestão e Descontaminação das Amostras	7
3.1.5.1 Agentes para digestão e descontaminação	8
3.1.6 Concentração	9
3.1.7 Coloração para Bacilos Ácido-Resistentes	10
3.1.7.1 Exame e interpretação dos esfregaços	12
3.1.8 Meios de Cultura e Métodos de Isolamento	14
3.1.8.1 Meios a base de ovos	15
3.1.8.2 Meios a base de ágar	16
3.1.8.3 Meio líquido	17
3.1.8.3.1 Sistema BACTEC AFB	17
3.1.8.3.2 Sistema MB/BacT	18
3.1.8.3.3 Sistema ESP MYCO	19
3.1.8.3.4 Sistema Septi-Chek AFB	19
3.1.8.3.5 Sistema tubo indicador de crescimento de micobactéria (MGIT)	20
3.1.8.4 Outros meios de cultura para recuperação de micobactérias	20
3.1.8.5 Sistema de lise-centrifugação	20
3.1.9 Identificação	21
3.1.9.1 Método tradicional	22
3.1.9.1.1 Morfologia de colônias	22
3.1.9.1.2 Velocidade de crescimento e temperatura	24
3.1.9.1.3 Pigmentação e fotorreatividade	25
3.1.9.1.4 Identificação bioquímica	25
3.1.9.2 Cromatografia	30
3.1.9.3 Análise do perfil plasmidial	31
3.1.9.4 Sondas de DNA	31
3.1.9.5 Detecção direta de <i>M. tuberculosis</i>	33
3.1.9.6 PCR-seqüenciamento	33
3.1.9.7 PCR-RFLP	44
3.1.9.8 Microarranjo de DNA	52
3.1.9.9 PCR-hibridização	53

3.1.10	Significado Clínico	55
3.2	HANSENÍASE	62
3.2.1	História	62
3.2.2	Etiologia.....	68
3.2.3	Epidemiologia.....	71
3.2.3.1	Distribuição geográfica	71
3.2.3.2	Transmissão.....	74
3.2.4	Genética da Suscetibilidade do Hospedeiro à Hanseníase.....	75
3.2.5	Reação de Mitsuda	78
3.2.6	Sinais e Sintomas.....	80
3.2.7	Classificação	81
3.2.8	Manifestações Clínicas e Reações	83
3.2.8.1	Manifestações clínicas	83
3.2.8.1.1	Hanseníase indeterminada.....	83
3.2.8.1.2	Hanseníase tuberculóide.....	84
3.2.8.1.3	Hanseníase virchowiana	85
3.2.8.1.4	Hanseníase dimorfa	88
3.2.8.2	Reações hansênicas	90
3.2.8.2.1	Reação tipo reversa	91
3.2.8.2.2	Reação tipo 2	92
3.2.9	Diagnóstico.....	93
3.2.9.1	Um caso de hanseníase.....	93
3.2.9.2	Diagnóstico da doença.....	93
3.2.10	Identificação Molecular de <i>M. leprae</i>	95
3.2.11	Tratamento	102
3.2.11.1	Tratamento poliquimioterápico	102
3.2.11.2	Acompanhamento do caso	103
4	MATERIAL E MÉTODOS	107
4.1	BIOSSEGURANÇA	107
4.2	MICRORGANISMOS.....	107
4.2.1	Cepas Referência.....	107
4.2.2	Amostras Clínicas	108
4.3	CULTIVO DE MICRORGANISMOS	109
4.4	RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA BACTERIANA	110
4.5	PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS PARA REMOÇÃO DE MICOBACTÉRIAS..	110
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA DE MICOBACTÉRIAS DE BIÓPSIAS E CULTURAS ...	113
4.6.1	Extração de DNA das Culturas de Micobactérias.....	113
4.6.2	Extração de DNA das Amostras Clínicas	115
4.6.3	Quantificação e Determinação da Pureza do DNA Genômico	115
4.6.4	Eletroforese	116
4.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR): SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS-ALVO E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO	116
4.7.1	Amplificação do Fragmento do Gene <i>hsp65</i>	117
4.7.2	Amplificação do Fragmento do Gene <i>rpoB</i>	118
4.8	POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP) ..	120
4.9	ANÁLISE DE DADOS.....	121
5	RESULTADOS.....	122

5.1 EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	122
5.2 PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS	124
5.2.1 Pesquisa de Bacilos Ácido-Resistentes	125
5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	127
5.3.1 Amplificação do Fragmento do Gene <i>hsp65</i>	127
5.3.2 Amplificação do Fragmento do Gene <i>rpoB</i>	130
5.4 POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP) ..	
.....	132
5.4.1 RFLP dos Fragmentos do Gene <i>hsp65</i>	132
5.4.2 RFLP dos Fragmentos do Gene <i>rpoB</i>	138
6 DISCUSSÃO	159
7 CONCLUSÕES	170
REFERÊNCIAS.....	171
ANEXOS	185

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE RUNYON PARA MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (NTM).....	6
TABELA 2	- MÉTODO DE INFORME DO NÚMERO DE BACIOS ÁCIDO-RESISTENTES OBSERVADOS EM ESFREGAÇOS CORADOS.....	13
TABELA 3	- ESQUEMA DE TRATAMENTO PARA MICOBACTÉRIAS....	22
TABELA 4	- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS.....	23
TABELA 5	- TESTES BIOQUÍMICOS CHAVES PARA AUXILIAR NA DISTINÇÃO DE MICOBACTÉRIAS PERTENCENTES AO MESMO GRUPO.....	25
TABELA 6	- GENÔMICA COMPARATIVA DE <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i>	70
TABELA 7	- PAÍSES QUE AINDA NÃO ATINGIRAM A META DE ELIMINAÇÃO.....	72
TABELA 8	- TAXAS DE PREVALENCIA E DETECÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL EM 2005 POR REGIÃO.....	73
TABELA 9	- TENDÊNCIAS NA DETECÇÃO DE NOVOS CASOS ENTRE 2001-2005, POR REGIÃO.....	74
TABELA 10	- FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE RELACIONADAS COM BACILOSCOPIA E REAÇÃO DE MITSUDA, SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE MADRI.....	81
TABELA 11	- CORRELAÇÃO ENTRE AS CLASSIFICAÇÕES DE MADRI (1953), DE RIDLEY E JOPLING (1966) E DA OMS (1982) ADOTADAS PARA A HANSENÍASE.....	83
TABELA 12	- CEPAS REFERÊNCIA E RESPECTIVOS CÓDIGOS.....	107
TABELA 13	- INFORMAÇÕES REFERENTES AOS PACIENTES SUBMETIDOS À BIÓPSIA.....	109
TABELA 14	- VOLUME E CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES USADOS PARA PREPARAR 60 µl DA MISTURA DE PCR DO GENE <i>hsp65</i>	118
TABELA 15	- PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO SEM <i>TOUCHDOWN</i> DO GENE <i>hsp65</i>	118
TABELA 16	- PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO COM <i>TOUCHDOWN</i> DO GENE <i>hsp65</i>	118
TABELA 17	- VOLUME E CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES USADOS PARA PREPARAR 60 µl DA MISTURA DE PCR DO GENE <i>rpoB</i>	119
TABELA 18	- PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO SEM <i>TOUCHDOWN</i> DO GENE <i>rpoB</i>	119
TABELA 19	- PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO COM <i>TOUCHDOWN</i> DO GENE <i>rpoB</i>	120
TABELA 20	- VOLUMES DOS REAGENTES USADOS PARA PREPARAR A MISTURA DE DIGESTÃO.....	120
TABELA 21	- SEQUÊNCIAS DE RECONHECIMENTO PARA AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>HaeIII</i> , <i>BstEII</i> E <i>BstU I</i>	121

TABELA 22	- PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA EM µg/ml DETERMINADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA REFERENTES AS CEPAS <i>M. kansasii</i> E <i>M. phlei</i>	122
TABELA 23	- PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA EM µg/ml DETERMINADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA REFERENTES AS MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS.....	123
TABELA 24	- PESQUISA DE BACILOS ÁCIDO-RESISTENTES NAS FRAÇÕES SOBRENADANTE E SEDIMENTO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS.....	126
TABELA 25	- AMOSTRAS, FRAÇÕES AMPLIFICADAS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i>	129
TABELA 26	- AMOSTRAS, FRAÇÕES AMPLIFICADAS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i>	132
TABELA 27	- FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 439 pb DO GENE <i>hsp65</i> PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA.....	135
TABELA 28	- FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 439 pb DO GENE <i>hsp65</i> PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	138
TABELA 29	- FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 342 pb DO GENE <i>rpoB</i> PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA.....	141
TABELA 30	- FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 342 pb DO GENE <i>rpoB</i> PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	145
TABELA 31	- RESUMO DOS DADOS DOS PACIENTES DOADORES DE HANSENOMA NO QUE SE REFERE AO TRATAMENTO, BACILOSCOPIA, PCR E RFLP.....	146
TABELA 32	- TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS.....	197
TABELA 33	- VOLUME DE REAGENTES USADOS PARA O PREPARO DE GEL DE POLIACRILAMIDA.....	199

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- COLORAÇÃO POR ZIEHL-NEELSEN DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
FIGURA 2	- APARÊNCIA TÍPICA DE MICOBACTÉRIAS EM MEIO SÓLIDO.....	24
FIGURA 3	- MODELO ESQUEMÁTICO DA PAREDE CELULAR DO <i>M. leprae</i>	69
FIGURA 4	- TAXA DE PREVALÊNCIA NO FINAL DE 2005.....	72
FIGURA 5	- ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE.....	79
FIGURA 6	- HANSENOMAS.....	86
FIGURA 7	- FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS.....	112
FIGURA 8	- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8% DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS CEPAS <i>M. kansasii</i> E <i>M. phlei</i>	122
FIGURA 9	- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8% DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS.....	124
FIGURA 10	- HANSENOMA HUMANO OBTIDO POR BIÓPSIA.....	124
FIGURA 11	- BACIOS ÁCIDO-RESISTENTES DA FRAÇÃO SOBRENADANTE CORADOS PELA TÉCNICA ZIEHL-GABBET OBSERVADOS NO AUMENTO DE 1000X.....	127
FIGURA 12	- BACIOS ÁCIDO-RESISTENTES DA FRAÇÃO SEDIMENTO CORADOS PELA TÉCNICA ZIEHL-GABBET OBSERVADOS NO AUMENTO DE 1000X.....	127
FIGURA 13	- PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS.....	128
FIGURA 14	- PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS.....	129
FIGURA 15	- PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS.....	130
FIGURA 16	- PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS.....	131
FIGURA 17	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%.....	133
FIGURA 18	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%.....	134
FIGURA 19	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%.....	136

FIGURA 20	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%.....	137
FIGURA 21	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%.....	139
FIGURA 22	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> UI PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%.....	140
FIGURA 23	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%.....	142
FIGURA 24	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> UI PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%.....	143
FIGURA 25	- PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III E <i>Bst</i> UI PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8% APÓS PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	144
FIGURA 26	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bst</i> EII, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>hsp65</i> , DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	148
FIGURA 27	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bst</i> EII, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>hsp65</i> , DAS CEPAS REFERÊNCIAS.....	149
FIGURA 28	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae</i> III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>hsp65</i> , DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	150
FIGURA 29	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae</i> III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>hsp65</i> , DAS CEPAS REFERÊNCIAS.....	151
FIGURA 30	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bst</i> UI, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES	

	PARA O GENE <i>rpoB</i> , DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	152
FIGURA 31	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bst</i> UI, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>rpoB</i> , DAS CEPAS REFERÊNCIAS.....	153
FIGURA 32	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae</i> III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>rpoB</i> , DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	154
FIGURA 33	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hae</i> III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE <i>rpoB</i> , DAS CEPAS REFERÊNCIAS.....	155
FIGURA 34	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (<i>Hae</i> III, <i>Bst</i> UI, <i>Bst</i> EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES <i>rpoB</i> E <i>hsp65</i> , DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	156
FIGURA 35	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (<i>Hae</i> III, <i>Bst</i> UI, <i>Bst</i> EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES <i>rpoB</i> E <i>hsp65</i> PARA CEPAS REFERÊNCIAS.....	157
FIGURA 36	- DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (<i>Hae</i> III, <i>Bst</i> UI, <i>Bst</i> EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES <i>rpoB</i> E <i>hsp65</i> PARA AMOSTRAS CLÍNICAS E CEPAS REFERÊNCIAS.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	- Antes de Cristo
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	- American Type Culture Collection
B	- <i>Borderline</i>
BB	- <i>Bordrelina-Borderline</i>
BL	- <i>Borderline</i> -Lepromatoso
Borstel	- National Research Institute for Mycobacteria, Borstel
BT	- <i>Borderline</i> -Tuberculóide
CIPT	- Collection Institut Pasteur de Paris-Tuberculose
CPPI	- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
D	- Dimorfo
d.C.	- Depois de Cristo
DD	- Dimorfo-Dimorfo
DL	- Dimorfo-Lepromatoso
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	- DNA ribossômico
DSM	- Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DT	- Dimorfo-Tuberculóide
DV	- Dimorfo-Virchoviano
E-MTD	- Enhanced <i>M. tuberculosis</i> Direct Test
ENH	- Eritema Nodoso da Hanseníase
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Pressão
I	- Indeterminado
IP	- Institut Pasteur
ITS	- Sequência Intergência 16S-23S DNAr
L	- Lepromatoso
LCR	- Líquido Cefalorraquidiano
LJ	- Löwenstein-Jensen
LL	- Lepromatoso-Lepromatoso

MAC	- Complexo <i>M. avium</i> , formado por <i>M. avium</i> e <i>M. intracellulare</i>
MAIS	- Complexo <i>M. avium/intracellulare/srofulaceum</i>
BCG	- Bacilo Calmette-Guérin
NCTC	- National Collection of Type Culture
NTM	- Micobactérias não Tuberculosas
OCF	- Italian Reference Laboratory for Mycobacteria
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PGL	- Glicolipídio Fenólico
PQT	- Poliquimioterapia
RFLP	- Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RIDOM	- Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNAr	- RNA ribossômico
T	- Tuberculóide
TAE	- Tris-Acetato-EDTA
TBE	- Tris-Borato-EDTA
TD PCR	- <i>Touchdown</i> PCR
TE	- Tris-EDTA
TT	- Tuberculóide-Tuberculóide
V	- Virchowiano

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento
°C	- Graus Celsius
>	- Maior que
<	- Menor que
X	- Vezes
A_{260}/A_{280}	- Razão entre as absorbância a 260 nm e a 280 nm
Bis	- N,N'-metilenobisacrilamida
C	- Citosina
Célula T CD4	- Células T com o co-receptor CD4
cm	- Centímetros
CO ₂	- Dióxido de carbono
dNTP	- Deoxinucleosídeo trifosfato
e ⁻	- Elétron
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
³² P	- Fósforo radioativo
G	- Guanina
g	- Grama ou força centrífuga relativa
H	- Hidrogênio
H ₂ O	- Água
HCl	- Ácido clorídrico
Kb	- Kilobases
KCl	- Cloreto de potássio
KDa	- Kilodalton
M	- Molar
<i>M. sp</i>	- Amostra de cultura proveniente de lesão de paciente hanseniano
Mb	- Megabase
MFO, MGI, MKA, TEM, OCM	- Isolados clínicos de Mycobacteriology Laboratory of Verena Hospital

mg	- Miligramas
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
min	- Minuto
ml	- Mililitros
ML1	- Amostra de <i>M. leprae</i> cedida pela FIOCRUZ
mm	- Milímetros
mM	- Milimolar
mm ³	- Milímetros cúbicos
NaCl	- Cloreto de sódio
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
pb	- Pares de base
pH	- Potencial dos íons hidrogênio
pmol	- Picomol
s	- Segundo
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil etileno diamina
Tris	- Tris(hidroximetil)aminometano
U	- Unidade enzimática
V	- Volts
µg	- Micrograma
µl	- Microlitro
µm	- Micrômetro
µM	- Micromolar

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que acomete principalmente a pele e o sistema nervoso periférico. Para a classificação da doença e avaliação da resposta imune do indivíduo ao *M. leprae*, usa-se o teste de Mitsuda. Este teste consiste na injeção intradérmica da mitsudina integral ou antígeno de Mitsuda, que provoca uma reação tardia denominada reação de Mitsuda, cuja leitura é realizada quatro semanas após a aplicação. A mitsudina é uma suspensão de *M. leprae* mortos pelo calor, os quais são obtidos de hansenomas de pacientes com hanseníase virchowiana ou de tecidos de tatu infectados com *M. leprae*, isso porque o agente causador da doença não é cultivável *in vitro*. Para investigar a presença de *M. leprae* e/ou outras micobactérias nas lesões de pacientes com hanseníase, que por sua vez são utilizadas como matéria-prima para a produção de mitsudina, um pequeno fragmento dos hansenomas foi removido para a identificação molecular de micobactérias. Os métodos PCR-RFLP para o genes *hsp65* e *rpoB* permitiram a diferenciação das espécies de micobactérias estudadas, com exceção dos membros do complexo *M. tuberculosis*. Dos 23 hansenomas, apenas 12 (52,17%) continham numerosos bacilos e amplificaram para micobactérias. Além de *M. leprae*, encontrou-se *M. szulgai*, em um dos hansenomas. Na cultura de micobactérias obtida de lesão cutânea profunda de paciente com hanseníase virchowiana identificou-se *M. kansasii*. Os dados obtidos com esta pesquisa contribuirão para melhorar a qualidade da mitsudina até então produzida, através da aplicação da metodologia aqui padronizada para a seleção de amostras adequadas, assim como, os dados servirão de suporte para futuro desenvolvimento de antígeno para intradermoreação em substituição a mitsudina.

Palavras-chaves: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, hansenomas, micobactérias, identificação molecular.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infection disease caused by *Mycobacterium leprae* which affects mainly the skin and the peripheral nervous system. The Mitsuda reaction has been classically used for disease classification and evaluation of individual immune response against *M. leprae*. This test consists of an intradermic injection of integral lepromin, also known as Mitsuda antigen, that provokes a late reaction called Mitsuda reaction. This reaction is read four weeks after injection. Because *M. leprae* is not cultivable *in vitro*, lepromin has to be prepared from a suspension of heat-killed *M. leprae* obtained either from lepromas of patients with lepromatous leprosy or from tissue of armadillo infected with *M. leprae*. In order to investigate the presence of *M. leprae* and/or other mycobacteria in lesions from patients with leprosy, as used as raw material for lepromin production, a small fragment of the lepromas was removed and submitted to molecular techniques for mycobacteria identification. PCR-RFLP methods for *hsp65* and *rpoB* gene markers allowed the differentiation of several species of mycobacteria, the exception being the *M. tuberculosis* complex members. From 23 lepromas, only 12 (52.17%) revealed large numbers of bacilli that amplified for mycobacteria. In addition to *M. leprae*, *M. szulgai* was detected in one of the lepromas. A mycobacteria isolate cultivated from a deep cutaneous lesion of one patient with lepromatous leprosy was identified as *M. kansasii*. Our data will contribute to improve the quality of lepromin production by using the methodology here standardized for selecting appropriate samples. In addition, this data will provide support for future antigen development for intradermoreaction in substitution of lepromin.

Key words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, lepromas, mycobacteria, molecular identification.

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que acomete a pele, os nervos periféricos e, ocasionalmente, outros órgãos. Apesar da redução na taxa de prevalência nas últimas duas décadas, a taxa de detecção de novos casos não declinou substancialmente. A hanseníase permanece um problema de saúde pública em seis países no mundo, incluindo o Brasil. Uma vez infectado, o indivíduo pode manifestar a doença em um espectro de formas clínicas que pode variar da forma tuberculóide à forma virchowiana.

O diagnóstico da hanseníase é baseado em alguns sinais, como a presença de anestesia em lesões cutâneas, o espessamento de nervos periféricos e a demonstração de *M. leprae* nos esfregaços de linfa e cortes histológicos de tecidos.

Para a classificação da doença e avaliação da resposta imune do indivíduo ao *M. leprae*, usa-se o teste de Mitsuda. Este teste consiste na injeção intradérmica da mitsudina ou antígeno de Mitsuda, que provoca uma reação tardia denominada de reação de Mitsuda, cuja leitura é realizada quatro semanas após a aplicação. A mitsudina é uma suspensão de *M. leprae* inativados pelo calor, os quais são extraídos de hansenomas de pacientes com hanseníase virchowiana ou de tecidos de tatu infectados com *M. leprae*, isso por que o agente causador da doença não é cultivável *in vitro*.

O único fornecedor de mitsudina para o Ministério da Saúde é o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), localizado em Piraquara, região metropolitana de Curitiba, Paraná, que produz a mitsudina desde 1990, a partir de hansenomas provenientes dos serviços públicos de Saúde do Estado do Paraná e de outros estados do país. Os problemas encontrados na produção deste antígeno são a dificuldade de obtenção dos hansenomas e os riscos associados à manipulação de amostras contaminadas com *M. leprae*. Estes problemas são por si só suficientes para a pesquisa de novos antígenos para intradermorreação.

Para a seleção dos hansenomas e conseqüentemente de *M. leprae* na confecção do antígeno é necessário conhecer se a biópsia contém ou não micobactérias. Além disso, a observação em microscópio óptico, método utilizado na

produção da mitsudina, possui a desvantagem de não permitir a identificação do agente presente. Portanto, a presença de outras micobactérias nos hanseomas e conseqüente inclusão das mesmas na mitsudina, vem reforçar a necessidade de antígenos alternativos ao antígeno de Mitsuda.

Quanto à variabilidade genética entre cepas de *M. leprae*, alguns estudos demonstram que não há diferenças entre isolados, enquanto outros mostram variação genética entre cepas. Na produção da mitsudina utilizam-se principalmente amostras provenientes do Paraná e o produto é distribuído para todo o Brasil, portanto, a questão é se as cepas de *M. leprae* encontradas no Paraná são as mesmas encontradas nos demais estados ou são diferentes, neste último caso, o produto deveria ser um *pool* de todas as cepas encontradas no Brasil.

Para a seleção adequada de antígenos, é necessária a padronização de metodologias que sejam rápidas e precisas capazes de identificar micobactérias em nível de espécie. Os métodos moleculares permitem a identificação de espécies diretamente em amostras clínicas o que vem auxiliar e melhorar a triagem de amostras para a produção do antígeno de Mitsuda, diminuindo, assim, reações cruzadas ou falso-positivos.

Os métodos de identificação baseados em características de cultura e em testes bioquímicos apresentam a desvantagem de requerem amostras frescas, são demorados, podem fornecer resultados incorretos e necessitam de técnicos altamente treinados.

Por esta razão, o presente trabalho visa padronizar método de PCR-RFLP para identificar diferentes espécies de micobactérias quer seja em culturas, quer seja em tecidos infectados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Testar e implementar protocolo de identificação molecular de micobactérias a ser aplicado na avaliação pré-processamento de hansenomas humanos utilizados na produção de mitsudina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes protocolos de extração de DNA de micobactérias;
- Padronização de protocolo de identificação de micobactérias por PCR-RFLP;
- Aplicar as técnicas desenvolvidas na identificação molecular de micobactérias isoladas de pacientes hansenianos;
- Verificar polimorfismo entre as cepas isoladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* compreende 125 espécies (EUZÉBY, 2006), sendo que *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, e *M. leprae*, responsável pela hanseníase são as espécies mais conhecidas (VOSSLER, 2000). Este gênero inclui, além de microrganismos patogênicos, microrganismos saprófitas (HALL; HOWARD, 1994). Os organismos patogênicos produzem doença em humanos e animais (VOSSLER, 2000).

3.1.1 Características Gerais

As micobactérias são bacilos delgados, levemente curvados ou retos, com tamanho de 0,2 a 0,4 x 2 a 10 μm . São microrganismos aeróbicos, imóveis e não formadores de esporos (VOSSLER, 2000).

A parede celular das micobactérias contém um glicopeptídeo unido a um polissacarídeo de cadeia ramificada denominado arabinogalactana, por meio de ligações fosfodiéster. As terminações distais da arabinogalactana estão esterificadas com o ácido micólico. Os ácidos micólicos são ácidos graxos complexos, β -hidroxilados e α -substituídos, que ocorrem como ésteres. O complexo glicopeptídeo-ácido micólico-arabinogalactana forma o esqueleto da parede celular micobacteriana. As cadeias de carbono dos ácidos micólicos estão intercaladas com as de numerosos lipídios e glicolipídios associados à parede. Os lipídios são responsáveis por 60% do peso seco da parede celular das micobactérias (KONEMAN *et al.*, 2001).

Devido à parede celular desses microrganismos possuir alto conteúdo de lipídios, as células micobacterianas são difíceis de corar com corantes de anilina básicos como aqueles usados no método de Gram (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998). A aparência de micobactérias coradas por Gram pode ser variável. As micobactérias podem ser gram invisíveis, podendo aparecer como imagens coradas

negativamente ou como “fantasmas”, ou podem aparecer como bacilos gram-positivos em contas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Procedimentos de coloração especiais são usados para promover a incorporação de corantes. Uma vez coradas, as micobactérias resistem à descoloração com álcool acidificado. Esta resistência à descoloração por álcool-ácido é chamada ácido-resistência (NOLTE; METCHOCK, 1995). A ácido-resistência está associada às moléculas de ácido micólico-arabinogalactana, externas à camada glicopeptídica e que constituem a maior parte dos materiais da parede celular (KONEMAN *et al.*, 2001).

Outra importante característica é que as micobactérias crescem mais lentamente que a maioria das bactérias patogênicas em humanos, devido a sua superfície celular hidrofóbica. Esta hidrofobicidade faz com que os microrganismos se agrupem e assim os nutrientes não são facilmente acessíveis a célula. O crescimento é lento, com colônias tornando-se visíveis em dois a 60 dias em temperatura ótima (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

3.1.2 Classificação das Micobactérias

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* (o único gênero desta família), ordem *Actinomycetales* e classe *Actinomycetes*.

As micobactérias podem ser divididas em dois grandes grupos baseado em diferenças na epidemiologia e associação com doenças, estes dois grupos são: complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas (NTM).

O termo micobactérias não tuberculosas inclui todas as outras espécies de micobactérias que não pertencem ao complexo *M. tuberculosis*. Outros nomes são usados para designar micobactérias não tuberculosas, como: anônimas, atípicas, não classificadas, desconhecidas, tuberculóides, ambientais, oportunistas, micobactérias outras que o bacilo tubérculo (MOTT) (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998). O termo micobactérias não tuberculosas (NTM) parece ser o mais aceito para HALL e HOWARD (1994). Como afirmado indiretamente acima, para FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998) o *M. leprae* é uma micobactéria não tuberculosa, enquanto para outros, como KOH, KWON e LEE (2002) o termo

micobactérias não tuberculosas se refere as micobactérias exceto o complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*.

RUNYON (1959) classificou as NTM em quatro grupos, I, II, III e IV, baseado principalmente na velocidade de crescimento e pigmentação das colônias (tabela 1). Os grupos I a III de Runyon se referem aos microrganismos de crescimento lento e grupo IV de Runyon se refere aos microrganismos de crescimento rápido. As NTM de crescimento lento podem ainda ser divididas em três grupos, que são chamados fotocromogênicas, escotocromogênicas e não-fotocromogênicas (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

TABELA 1 – ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE RUNYON PARA MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (NTM)

NÚMERO DO GRUPO	NOME DO GRUPO	DESCRIÇÃO
I	Fotocromogênicas	Colônias que desenvolvem pigmentos após exposição à luz e levam mais de sete dias para tornarem-se visíveis em meio sólido
II	Escotocromogênicas	Colônias que desenvolvem pigmentos na presença ou ausência de luz e levam mais de sete dias para tornarem-se visíveis em meio sólido
III	Não-fotocromogênicas	Colônias que não produzem pigmentos e levam mais de sete dias para tornarem-se visíveis em meio sólido
IV	Crescimento rápido	Colônias que tornam-se visíveis em meio sólido em sete dias ou menos

FONTE: Adaptado de FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **BAILEY & SCOTT'S**: diagnostic microbiology. 10th ed. St. Louis: Mosby. 1998. p. 719.

Deve ser notado, como em muitos esquemas de classificação, a classificação de Runyon nem sempre se mantém verdadeira, por exemplo, algumas NTM podem ser ou fotocromogênicas ou não-fotocromogênicas

Devido a dificuldade em determinar o significado clínico do isolado de uma amostra clínica, vários esquemas de classificação para NTM foram propostos. Por exemplo, um dos esquemas classifica as NTM recuperadas de humanos em quatro grupos (pulmonar, linfadenite, cutânea, disseminada) baseado na doença clínica que elas causam. Outra classificação é baseada no potencial patogênico dos microrganismos (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

3.1.3 Biossegurança

Práticas de biossegurança nível dois e equipamentos de retenção para preparar esfregaços para ácido-resistência e culturas são recomendados. Procedimentos que geram aerossóis devem ser realizados em cabine de segurança biológica classe II A ou B ou III. Se *M. tuberculosis* é cultivado e então propagado e manipulado, práticas de biossegurança nível três são recomendadas (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

3.1.4 Colheita e Processamento de Amostras

As micobactérias podem ser recuperadas de uma variedade de amostras biológicas, incluindo as provenientes do trato respiratório (escarro obtido por expectoração ou por nebulização, lavados brônquicos, lavados broncoalveolares, biópsias brônquicas e outras), urina, fezes, sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), biópsias de tecidos e aspirados profundos virtualmente de qualquer órgão ou tecido (VOSSLER, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

O sucesso do isolamento da micobactérias de amostras biológicas depende da coleta e manipulação dessas amostras. Os procedimentos para coletas e processamento das diferentes amostras encontram-se descritos em literatura específica, a saber, HALL e HOWARD (1994), NOLTE e METCHOCK (1995), FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998), VOSSLER (2000) e KONEMAN *et al.* (2001).

3.1.5 Digestão e Descontaminação das Amostras

Para assegurar uma recuperação ótima de micobactérias de amostras biológicas, muitas amostras devem ser processadas antes da inoculação em meios de cultura. Amostras de locais estéreis do corpo devem ser simplesmente concentradas (se em grande volume) e inoculadas. Porém, amostras que podem conter bactérias comensais devem ser descontaminadas e concentradas (VOSSLER, 2000).

A elevada concentração de lipídios na parede celular da maioria da micobactérias torna esses microrganismos mais resistentes à ação letal de soluções ácidas ou alcalinas fortes do que outras bactérias que possam estar presentes na amostra. Em consequência, as amostras que podem conter microbiota bacteriana mista são tratadas com um agente descontaminante. Após o tratamento com agente descontaminante durante um período cuidadosamente controlado, o ácido ou o álcali utilizado é neutralizado e a mistura centrifugada em alta rotação, para concentrar as micobactérias (KONEMAN *et al.*, 2001).

A maioria das amostras biológicas, como escarro, contém mucina ou *debris* orgânicos que envolvem a bactéria dentro da amostra. Uma abundância de microrganismos não micobacterianos, bem como possíveis micobactérias, compõem a microflora dessas amostras. Quando em meio de culturas, os abundantes microrganismos não micobacterianos podem rapidamente crescer mais que as micobactérias. O propósito do processo de digestão-descontaminação é: liquefazer (liberar o organismo da mucina ou células) a amostra através da digestão do material proteináceo e permitir que o agente descontaminante entre em contato e exerça sua ação bactericida sobre os microrganismos não micobacterianos.

Amostra que contém muco e requerem tanto digestão e descontaminação são escarro, lavado gástrico, lavado broncoalveolar, lavado brônquico e aspirado transtraqueal. Urina, tecido de autópsia, fluido abdominal e qualquer fluido conhecido ser contaminado requer descontaminação. Amostras de locais normalmente estéreis, como sangue, LCR, fluido sinovial e tecidos de biópsia de órgãos profundos, não requerem descontaminação. A esterilidade deve ser mantida na coleta e transporte da amostra. Descontaminação de fezes é especialmente difícil e requer repetidas tentativas de descontaminação (VOSSLER, 2000).

3.1.5.1 Agentes para digestão e descontaminação

Cada laboratório deve manter um balanço adequado entre taxa de recuperação de micobactérias e a supressão do crescimento de contaminantes. Falhas no isolamento de micobactérias de pacientes com sinais e sintomas de doença micobacteriana clássica pode indicar que o processo de descontaminação é

muito severo. Por outro lado, se mais de 5% de todas as amostras cultivadas são contaminadas, o processo de descontaminação pode estar inadequado. A ação bactericida de um agente descontaminante é influenciada pela concentração do agente, tempo de exposição e temperatura, logo, alterações em qualquer um dos fatores podem aumentar ou diminuir o efeito bactericida. Em geral, uma faixa que é considerada aceitável nesse delicado balanço é entre 2% e 5% de culturas micobacterianas contaminadas.

O processo de descontaminação ótimo requer um agente suave que permita crescimento de micobactérias e controle o crescimento de contaminantes. O uso de meios seletivos ou tratados com antibióticos pode diminuir a necessidade de processos de descontaminação severos (VOSSLER, 2000).

Os agentes descontaminantes mais utilizados são: N-acetil-L-cisteína (NALC) mais 2% de hidróxido de sódio, ditiotreitól mais 2% de hidróxido de sódio, fosfato trissódico a 13% mais cloreto de benzalcônio (Zephiran; Winthrop Laboratories, Nova York, N.Y.), hidróxido de sódio a 4%, fosfato trissódico a 13%, ácido oxálico a 5% e cloreto de cetilpiridino a 1% mais 2% de cloreto de sódio (KONEMAN *et al.*, 2001).

Não há um método de digestão e descontaminação ideal para todas as amostras clínicas, para todos os laboratórios e para todas as circunstâncias (NOLTE; METCHOCK, 1995). Cada micobacteriologista deve selecionar os agentes conforme a quantidade e o tipo de amostras recebidas, assim como o tempo e pessoal técnico disponíveis para processar as amostras (NOLTE, METCHOCK, 1995; KONEMAN *et al.*, 2001).

Os procedimentos de digestão e descontaminação encontram-se descritos em literatura específica como HALL e HOWARD (1994), NOLTE e METCHOCK (1995), FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998), VOSSLER (2000) e KONEMAN *et al.* (2001).

3.1.6 Concentração

O peso específico do bacilo varia de 1,07 a 0,79. Devido ao baixo peso específico do bacilo ácido-resistente, uma baixa força centrífuga tem um efeito

flutuante em vez de um efeito de sedimentação. O excesso de muco aumenta este efeito. O tratamento com agentes mucolíticos separa mucoproteínas, permitindo maior sedimentação. KENT E KUBICA¹, citados por VOSSLER (2000), sugerem que uma eficiência de sedimentação de 95% deve ser o objetivo para recuperação. Portanto, a velocidade de centrifugação deve ser ao menos de 3.000 g para maximizar a recuperação. Velocidades de centrifugação menores necessitam de tempos maiores. As consequências de tempos de centrifugação mais longos são: exposição prolongada aos efeitos tóxicos do agente de digestão-descontaminação usado em temperaturas mais altas geradas por centrífugas não refrigeradas. O agente de digestão-descontaminação usado, sua concentração, tempo de exposição e velocidade de centrifugação afetam a recuperação de micobactérias (VOSSLER, 2000).

3.1.7 Coloração para Bacilos Ácido-Resistentes

A natureza ácido-resistente de um organismo pode ser determinada por dois tipos de coloração:

1) Coloração com carbolfucsina: uma mistura de fucsina com fenol

a) Ziehl-Neelsen

b) Kinyoun

2) Coloração com fluorocromo: auramina O, com ou sem um segundo fluorocromo, rodamina.

Os ácidos micólicos existentes na parede celular cética, rica em lipídios, das micobactérias têm a capacidade de se ligarem aos corantes fucsina e auramina O, resistido à descoloração com álcool-ácido. Um corante de contraste é empregado para destacar o organismo corado e facilitar assim o reconhecimento ao microscópio.

A coloração de Ziehl-Neelsen é conhecida como “coloração quente” porque é utilizado calor para facilitar a penetração do corante fucsina através da parede celular. A coloração de Kinyoun é conhecida como “coloração fria” porque alta

¹ KENT, P. T.; KUBICA, G. P. **Public health mycobacteriology**: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.

concentração de fenol presente no reagente serve para “dissolver” o material lipídico da parede celular, permitindo a penetração do corante fucsina sem a utilização de calor. Uma vez corada, a parede celular mantém o corante “resistente”, o que lhe confere a característica coloração vermelha contra um fundo azul se o corante de contraste usado for o azul-de-metileno ou um fundo verde se o verde-brilhante for o corante de contraste empregado (KONEMAN *et al.*, 2001).

As bactérias coradas com fluorocromo aparecem em amarelo brilhante (auramina) ou laranja-avermelhado (rodamina) contra um fundo escuro, permitindo que a preparação possa ser observada com menor aumento sem perda da sensibilidade. As modificações da coloração com fluorocromo-auramina incluem adição de rodamina, que confere um aspecto dourado às células, ou o uso de laranja de acridina como corante de contraste, que produz fundo vermelho a laranja (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os esfregaços corados com o método de carbolfucsina devem ser observados com objetiva de imersão (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995; FORBES, SAHM, WEISSFELD, 1998; DELLA-LATTA, WEITZMAN, 1998; VOSSLER, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001). Em contraste, os esfregaços corados com fluorocromo podem ser observados com microscópio de fluorescência em objetiva de 25x a 40x (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 1998; DELLA-LATTA, WEITZMAN, 1998; VOSSLER, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001). Variações quanto ao aumento empregado para exame dos esfregaços corados com fluorocromo são encontradas em HALL e HOWARD (1994) e em NOLTE e METCHOCK (1995).

Visto que é possível ler uma superfície de esfregaço significativamente maior por unidade de tempo com a coloração fluorocrômica do que o método de carbolfucsina, a coloração fluorocrômica oferece como vantagem maior sensibilidade. Alguns laboratoristas utilizam o método de fluorocromo com propósitos de triagem e depois confirmam os achados, reexaminando a preparação após descoloração e recoloração com o método de carbolfucsina (KONEMAN *et al.*, 2001).

Geralmente as micobactérias aparecem em forma de bacilos, que podem se apresentar levemente curvados, curtos ou longos, mas, podem aparecer filamentosos ou cocóides. Os bacilos podem conter áreas muito coradas chamadas

contas e muitas vezes têm áreas claras e coradas alternadas, fazendo-os aparecerem em faixa (figura 1) (HALL; HOWARD, 1994).

FIGURA 1 – COLORAÇÃO POR ZIEHL-NEESEN DE *Mycobacterium tuberculosis*



FONTE: HOWARD, B. J. *et al.* **Clinical and pathogenic microbiology**. 2nd. ed. St. Louis: Mosby, 1994. p. C18-A.

A ácido-resistência pode ser em parte ou completamente perdida em algum estágio do crescimento por alguma proporção de células de algumas espécies. Micobactérias de crescimento rápido podem não ser coradas com a coloração por fluorocromo (NOLTE; METCHOCK, 1995). Segundo FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998), a ácido-resistência pode ser afetada, além do estágio do crescimento, pelo meio de cultura e luz ultravioleta.

Os procedimentos de coloração encontram-se descritos em FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998), DELLA-LATTA e WEITZMAN (1998), VOSSLER (2000) e KONEMAN *et al.* (2001).

3.1.7.1 Exame e interpretação dos esfregaços

Os esfregaços corados pelo método de carbolfucsina devem ser examinados por no mínimo 300 campos antes de serem relatados como esfregaços negativos. Enquanto, esfregaços corados com fluorocromo devem ser examinados por no mínimo 30 campos (VOSSLER, 2000).

Quando microrganismos ácido-resistentes são observados em um esfregaço, o resultado deve ser quantificado para ser significativo. Devido esta

quantificação estimar o número de bacilos excretados, a extensão da infecção do paciente pode ser avaliada para propósitos clínicos e epidemiológicos. As recomendações para interpretação e comunicação de micobactérias observadas em esfregaços corados para detecção de bacilos ácido-resistentes estão incluídas no tabela 2.

TABELA 2 – MÉTODO DE INFORME DO NÚMERO DE BACIOS ÁCIDO-RESISTENTES OBSERVADOS EM ESFREGAÇOS CORADOS

NÚMERO DE BACIOS ÁCIDO-RESISTENTES VISTOS			MÉTODO DE INFORME
Coloração com Carbolfucsina	Coloração com Fluorocromo		
1000x	250x	450x	
0	0	0	Ausência de bacilos ácido-resistentes
1-2/300 campos	1-2/30 campos	1-2/70 campos	Duvidoso; repetir
1-9/100 campos	1-9/10 campos	2-18/50 campos	1+
1-9/10 campos	1-9/campo	4-36/10 campos	2+
1-9/campo	10-90/campo	4-36/campo	3+
>9/campo	>90/campo	>36/campo	4+

FONTE: NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press, 1995. p. 413.

A contaminação cruzada de bacilos ácido-resistentes de um esfregaço para outro durante o processo de coloração e uso de água contaminada com micobactérias saprófitas pode conduzir a resultados falso-positivos. Jarras de coloração não devem ser empregadas; bacilos ácido-resistentes podem também ser transferidos de uma lâmina para outra via imersão em óleo (NOLTE, METCHOCK, 1995; FOBES, SAHM, WEISSFELD, 1998). A incidência de esfregaços falso-positivos é muito baixa quando um bom controle de qualidade é mantido (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

Na interpretação de esfregaços como positivo para ácido-resistência, os profissionais de laboratório devem estar atentos que outros microrganismos podem ser corados, como *Nocardia*, *Legionella micdadei* e *Rhodococcus* (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 1998; VOSSLER, 2000). Além destes microrganismos, FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998), incluem oocistos de *Cryptosporidium* e *Isospora*. DELLA-LATTA e WEITZMAN (1998) incluem, também, cistos de *Cyclospora*.

A sensibilidade em geral de esfregaços ácido-resistentes varia de 20% a 80% (VOSSLER, 2000). Fatores como tipo de amostra, método de coloração, método de cultivo podem influenciar a sensibilidade (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998). Um mínimo de 5×10^3 a 5×10^4 de bacilos por mililitro de escarro é requerido para a detecção por esfregaço, enquanto a cultura detecta tão pouco quanto 10 a 100 organismos viáveis.

Embora a sensibilidade do exame do esfregaço para ácido-resistência direto para o diagnóstico de infecção micobacteriana é baixo comparado com aquele de métodos de cultura, a coloração tem um importante papel para o diagnóstico precoce de doença, pois, longo tempo é requerido para detecção de micobactérias por cultura. É importante detectar a presença de doença micobacteriana tão rápido quanto possível para implementação de cuidados ao paciente e medidas de saúde pública apropriados. A coloração serve também para confirmar a natureza ácido-resistente de organismos recuperados de cultura e monitorar a eficiência da terapia antimicobacteriana. A quantificação de um esfregaço positivo é também usada como um apoio na determinação da diluição apropriada da amostra para teste de suscetibilidade (NOLTE; METCHOCK, 1995).

3.1.8 Meios de Cultura e Métodos de Isolamento

A velocidade de crescimento das micobactérias é lenta, com tempo de geração variando com a espécie e estendendo-se de 2 a maior que 20 horas. Colônias facilmente visíveis podem ser produzidas após 2 dias a 8 semanas de incubação sob condições ótimas, dependendo na espécie, o isolamento de *M. ulcerans* pode levar até 12 semanas. A temperatura ótima de crescimento varia entre as espécies, estendendo-se de 25° a 45°C. Uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂ no ar estimula o crescimento de todas as micobactérias cultivadas em tubos ou placas (NOLTE; METCHOCK, 1995). Para o meio de crescimento as micobactérias requerem um pH entre 6,5 a 6,8 e crescem melhor em umidade mais alta. Uma das micobactérias patogênicas para humanos, *M. leprae*, não é cultivável *in vitro* (VOSSLER, 2000).

Embora a maioria das micobactérias cresça em meios sintéticos simples uma vez adaptadas em crescimento *in vitro*, meios complexos devem ser usados para o isolamento primário (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995).

Os diferentes meios disponíveis para a recuperação de micobactérias de amostras biológicas são variações de três tipos principais: meio a base de ovos, meio com ágar e meio líquido. Dentro de cada tipo principal, existem meios não-seletivos e meios seletivos, sendo que estes possuem agentes antimicrobianos para prevenir o sobrecrecimento de contaminantes. Devido alguns isolados não crescerem em um meio particular e cada tipo de meio de cultura oferecer certas vantagens, a combinação de meios de cultura é geralmente recomendada para o isolamento primário. O uso de um meio sólido (meio a base de ovos ou meio com ágar) em combinação com um meio líquido é recomendado para o cultivo de amostras biológicas para a recuperação de bacilos ácido-resistentes (VOSSLER, 2000).

3.1.8.1 Meios a base de ovos

Os ingredientes básicos desses meios, como Löwenstein-Jensen (LJ), Petragnani e meio da American Thoracic Society são ovos inteiros frescos, gemas de ovos, farinha de batata e glicerol com variações mínimas em sais definidos, leite e batata. Cada um contém verde de malaquita para suprimir o crescimento de bactérias gram-positivas. O meio LJ é o mais usado em laboratórios clínicos (VOSSLER, 2000). O meio Petragnani contém maior concentração de verde de malaquita que o meio LJ, o que o faz adequado para amostras muito contaminadas. O meio da American Thoracic Society contém baixa concentração de verde de malaquita e por isso é mais adequado para amostras menos contaminadas (HALL; HOWARD, 1994).

Meios seletivos que contêm antibióticos, como meio Gruft (modificação de LJ) e Mycobactosel (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), são algumas vezes usados em combinação com meios não seletivos para aumentar o isolamento de micobactérias de amostras contaminadas (VOSSLER, 2000). O meio Gruft contém penicilina e ácido nalidíxico e o meio Mycobactosel contém

cicloheximida, lincomicina e ácido nalidíxico (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995).

3.1.8.2 Meios a base de ágar

Estes meios, tais como ágar Middlebrook 7H10 e ágar Middlebrook 7H11, são preparados de um meio basal de sais definidos, vitaminas, cofatores, glicerol, verde de malaquita e ágar combinado com um suplemento, que consiste de ácido oléico, albumina bovina, glicose e catalase (meio de enriquecimento Middlebrook OADC). O ágar Middlebrook 7H11 também contém 0,1% de hidrolisado de caseína, o qual melhora a recuperação de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida. A adição de agentes antimicrobianos torna os meios mais seletivos por suprimir o crescimento de bactérias contaminantes. O meio Mitchison, meio Middlebrook 7H11 seletivo, contém polimixina B, anfotericina B, carbenicilina e lactato de trimetoprima (VOSSLER, 2000).

Suplementos adicionais podem ser úteis para a recuperação de micobactérias e em certas situações, por exemplo, a adição de 0,2% de ácido pirúvico é recomendado se *M. bovis* é suspeitado e 0,25% de L-asparagina ou 0,1% de aspartato de potássio deve ser adicionado ao ágar 7H10 para maximizar a produção de niacina (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Embora os meios seletivos 7H10 e 7H11 são muito efetivos, eles devem ser usados em combinação com meios não seletivos (HALL; HOWARD, 1994).

Em contraste aos meios opacos a base de ovos, os meios à base de ágar são transparentes e podem ser examinados usando um estereomicroscópio para detecção precoce de crescimento e morfologia das colônias. Testes de susceptibilidade à drogas podem ser realizados em meio a base de ágar sem a alteração da concentração de drogas que ocorre com os meios a base de ovos. (VOSSLER, 2000). Segundo NOLTE e METCHOCK (1995), colônias podem ser observadas em 10 a 12 dias, em contraste a 18 a 24 dias com meio a base de ovos.

Certas precauções devem ser seguidas na preparação, estocagem e incubação de meio Middlebrook. Excesso de calor e exposição a luz pode resultar

na liberação de formaldeído, o qual é tóxico para as micobactérias (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995; VOSSLER, 2000).

3.1.8.3 Meio líquido

Os meios líquidos são usados para subcultivo de cepas estoque, preparo de inóculo para procedimentos de identificação e para isolamento primário de micobactérias de amostras fluidas. Os meios líquidos geralmente usados são o caldo Middlebrook 7H9 e caldo Dubos Tween albumina (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995; VOSSLER, 2000).

Existem vários sistemas de meio líquido para cultivo e detecção de crescimento de micobactérias. Estes sistemas são: sistema BACTEC AFB (Becton Dickinson Diagnostic Systems Instruments, Sparks, MD), sistema MB/BacT (Organon Teknika Durhan, NC), sistema ESP MYCO (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), sistema Septi-CheK AFB (BBL) e sistema MGIT (Becton Dickinson Diagnostic, Cockeysville, MD). Os três primeiros são sistemas automatizados, enquanto, os dois últimos são manuais. O índice de recuperação e o tempo necessário para a positividade de micobactérias provenientes de materiais biológicos melhoram com o emprego de meios de cultura líquidos e por isso, o uso destes meios líquidos é amplamente recomendado (KONEMAN *et al.*, 20001).

3.1.8.3.1 Sistema BACTEC AFB

O sistema BACTEC é um sistema de cultura radiométrico para a detecção do crescimento de micobactérias. O sistema BACTEC contém um substrato (ácido palmítico) marcado com ^{14}C que é metabolizado pelas micobactérias, liberando dióxido de carbono radioativo ($^{14}\text{CO}_2$) para o espaço superior do frasco. A quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ é detectada pelo instrumento BACTEC 460 e interpretado como um índice de crescimento. É assumido que a liberação de CO_2 indica crescimento do microrganismo. Antibióticos fornecidos pelo fabricante – polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprina e azlocilina (PANTA) reconstituído em estearato de

polioxietileno, um agente de aumento de crescimento – são adicionados a cada frasco no momento da inoculação.

Estudos mostram que o método de isolamento BACTEC melhora significativamente a taxa de isolamento de micobactérias e reduz o tempo de recuperação comparado com meios de isolamento convencionais. Com o método BACTEC, micobactérias podem ser detectadas em amostras biológicas em menos de duas semanas (VOSSLER, 2000).

As desvantagens do sistema incluem o custo do instrumento, a impossibilidade de observar a morfologia das colônias e detectar cultivos mistos, o sobrecrecimento de contaminantes, a necessidade de descartar materiais radioativos e o uso extensivo de agulhas (KONEMAN *et al.*, 20001).

O sistema BACTEC pode não ser bom na recuperação de todas as espécies de *Mycobacterium*, especialmente *M. fortuitum* e complexo *M. avium*. Resultados falso-positivos de contaminação cruzadas foram relatados (VOSSLER, 2000).

O sistema BACTEC pode ser usado para teste de suscetibilidade antimicrobiana de *M. tuberculosis*. Geralmente, não é recomendado para testes de sensibilidade de micobactérias não tuberculosas (VOSSLER, 2000).

3.1.8.3.2 Sistema MB/BacT

É um sistema não-radiométrico para detecção de micobactérias. Os frascos MB/BacT contêm caldo Middlebrook 7H9 em atmosfera de CO₂, nitrogênio e oxigênio sob vácuo. Antes da inoculação, deve ser adicionado em cada frasco o suplemento antibiótico reconstituído para micobactérias (MAS), que contém anfotericina B, azlocilina, ácido nalidíxico, polimixina B, trimetoprima e fatores de crescimento, para estimular o desenvolvimento de micobactérias e reduzir o de bactérias contaminantes que podem sobreviver ao procedimento de descontaminação e concentração. O fundo de cada frasco está equipado com um sensor permeável ao gás e que muda de verde-escuro para amarelo-claro quando CO₂ é produzido no caldo pelo metabolismo das micobactérias. Os frascos são colocados em orifícios individuais na câmara incubadora, e a monitoração contínua de produção de CO₂ pelas bactérias é realizada utilizando-se luz refletida. A

detecção colorimétrica, não-radiométrica, do crescimento micobacteriano, eliminando a necessidade de manipulação e descarte de radioisótopos é uma nítida vantagem (KONEMAN *et al.*, 20001).

3.1.8.3.3 Sistema ESP MYCO

Cada frasco de cultivo é unido a um sensor e monitorado continuamente para detecção de qualquer alteração na pressão de gás devida à atividade metabólica dos microrganismos. Mudanças de pressão significativas podem ser assinaladas precocemente a partir do consumo de oxigênio, ou mais tarde, com a produção de gases do metabolismo dos microrganismos.

Cada frasco contém meio de Middlebrook 7H9 modificado, casitone, glicerol e esponjas de celulose. As esponjas proporcionam uma plataforma de crescimento para as micobactérias, simulando alvéolos pulmonares. Antes da inoculação da amostra, o meio em cada frasco é suplementado com a mistura antibiótica (PVNA) que contém polimixina B, vancomicina, ácido nalidíxico e anfotericina B. O método de detecção não-radiométrico utilizado, também, elimina a necessidade de manipular e descartar materiais radioativos (KONEMAN *et al.*, 20001).

3.1.8.3.4 Sistema Septi-Chek AFB

É um sistema de cultura bifásico composto de um frasco com caldo Middlebrook 7H9 modificado e uma placa em forma de remo contendo ágar chocolate, meio Löwenstein-Jensen e ágar Middlebrook 7H11. Antes da inoculação da amostra, adiciona-se um suplemento reconstituído, composto de glicose, glicina, ácido oléico, piridoxina, trimetoprima, polimixina B e anfotericina B. O frasco é invertido regularmente para inocular os meios sólidos. O crescimento é detectado pela observação da superfície dos meios de ágar e caldo (KONEMAN *et al.*, 20001).

3.1.8.3.5 Sistema tubo indicador de crescimento de micobactéria (MGIT)

O sistema consiste de um tubo contendo caldo basal 7H11 modificado, ao qual são adicionados OADC como enriquecimento (ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase) e uma mistura antibiótica PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina). No fundo do tubo encontra-se um composto fluorescente embebido em silicone. Este composto é sensível ao oxigênio dissolvido no caldo, isto é, a presença do oxigênio no meio não-inoculado serve para extinguir a emissão de luz fluorescente. Como o crescimento bacteriano ativo consome o oxigênio dissolvido, a fluorescência é revelada e pode ser detectada por exame do tubo sob luz ultravioleta. O crescimento pode ser detectado mediante observação de turvação heterogênea ou de pequenos grânulos ou flocos no meio de cultura (KONEMAN *et al.*, 20001).

3.1.8.4 Outros meios de cultura para recuperação de micobactérias

M. haemophilum crescerá em meios a base de ovos ou ágar se o meio estiver suplementado com hemina, hemoglobina ou citrato de amônio férrico. Portanto, amostras de lesões de pele, articulações ou ossos, devem ser inoculadas em ágar chocolate; ágar Middlebrook 7H10 com hemolisado de eritrócitos de carneiro, hemina ou um disco de fator-X; ou meio de Löwenstein-Jensen contendo 1% de citrato de amônio férrico para aumentar a recuperação deste organismo. Meio BACTEC deverá ser semelhantemente suplementado (NOLTE; METCHOCK, 1995)

3.1.8.5 Sistema de lise-centrifugação

O sistema Isolator (Wampole Laboratorios, Cranbury, N.J.) é um sistema de coleta que contém saponina para liberar microorganismos intracelulares. Após o tratamento com saponina, a amostra de sangue é inoculada em meios para micobactérias. O sistema permite aumento no rendimento e redução do tempo de recuperação de micobactérias. O sistema oferece a vantagem de produzir colônias isoladas e a capacidade de quantificar micobacteremia, a qual pode ser útil no

monitoramento da efetividade da terapia na infecção disseminada pelo complexo *M. avium* (VOSSLER, 2000).

3.1.9 Identificação

As micobactérias devem ser identificadas ao nível de espécie sempre que possível. De acordo com métodos tradicionais, as micobactérias são geralmente identificadas pela velocidade de crescimento, morfologia das colônias, pigmentação e para propósitos diferenciais, perfis bioquímicos. A identificação deve ser baseada em tantas observações quantas possíveis, mas, é prudente selecionar apenas testes bioquímicos chaves que pareçam ser úteis para a espécie suspeitada. Os métodos tradicionais são bem estabelecidos, padronizados, relativamente baratos, mas lentos em fornecer informações relevantes clinicamente (NOLTE; METCHOCK, 1995). Segundo TAKEWAKI *et al.* (1994) micobactérias podem levar de três a oito semanas para crescer e outras duas a quatro semanas são necessárias para a identificação final por testes bioquímicos. E nem sempre a identificação baseada em características de cultura e testes bioquímicos fornece resultados corretos (LEE *et al.*, 2000; WONG *et al.*, 2001). Com o recente aumento de infecções causadas por *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas, há uma demanda aumentada para métodos de diagnóstico mais específicos, sensíveis e rápidos para sua detecção e identificação (KIM *et al.* 2004). A identificação de micobactérias é importante para estabelecer o tratamento adequado e para estudos epidemiológicos (KIM *et al.* 2001). A tabela 3 mostra o esquema de tratamento para uma espécie e um complexo de micobactérias.

TABELA 3 – ESQUEMA DE TRATAMENTO PARA MICOBACTÉRIAS

ESPÉCIE	TRATAMENTO		DURAÇÃO
Complexo <i>M. avium</i>	Claritromicina	ou	Até cultura negativa por 12 meses
	Azitromicina	+	
	Etambutol	+	
	Rifabutina	±	
	Estreptomicina	Ou	
	Amicacina		
<i>M. kansasii</i>	Rifampina	+	EUA: 18 meses, cultura negativa ao menos por 12 meses Reino Unido: 9 a 12 meses
	Etambutol	+	
	Isoniazida		
	(para doença severa: estreptomocina ou claritromicina)		

FONTE: WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection*, v. 31, n. 5, p. 262, 2003.

O *M. leprae* não cresce em meios artificiais, portanto, o diagnóstico laboratorial deste organismo difere de outras micobactérias.

A microscopia é o primeiro passo na identificação. A coloração para ácido-resistência é usada para confirmar se o isolado é micobactéria e determinar se a cultura está contaminada com outras bactérias. Embora certas características morfológicas são associadas com certas espécies, as características morfológicas microscópicas não devem ser a base para a identificação final da espécie (NOLTE; METCHOCK, 1995).

3.1.9.1 Método tradicional

3.1.9.1.1 Morfologia de colônias

A morfologia das colônias pode ser observada em colônias individuais com lente de mão (3X – 10X) ou um estereomicroscópio (10X – 50X). Se o crescimento é confluyente, um subcultivo deve ser feito para obter colônias isoladas. O micobacteriologista deve observar várias características coloniais como textura, forma e pigmentos (HALL; HOWARD, 1994). As características coloniais de algumas micobactérias estão reunidas na tabela 4 e sua aparência em meio sólido na figura 2.

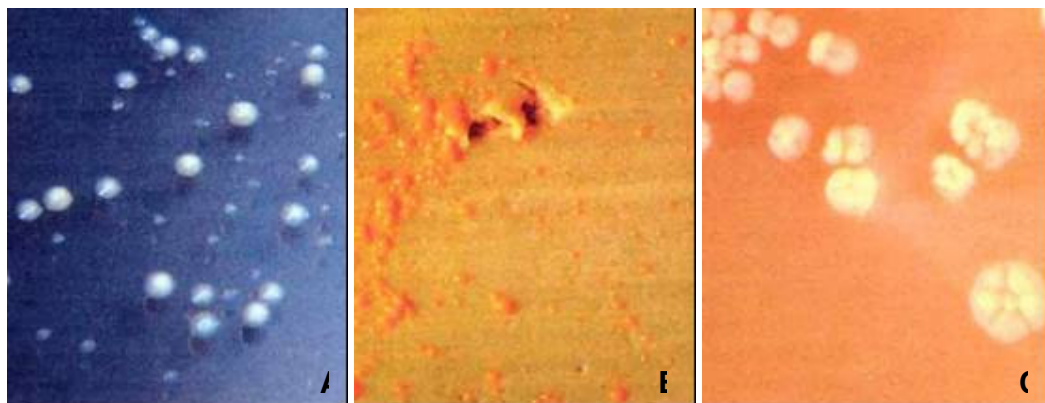
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

MICROORGANISMO	MORFOLOGIA DE COLÔNIAS EM MEIO LÖWENSTEIN-JENSEN (LJ)	MORFOLOGIA DE COLÔNIAS EM ÁGAR 7H10
<i>M. avium-intracellulare</i>	As colônias são geralmente lisas, em forma de cúpula e amarelas; colônias rugosas são algumas vezes vistas; na mesma culturas podem aparecer mais de um tipo de colônia	As colônias são geralmente lisas, circulares, finas transparentes e em forma de pirâmide ou hemisféricas; como no meio LJ, colônias rugosas podem ser vistas e mais de um tipo de colônia pode aparecer na cultura
<i>M. fortuitum</i>	As colônias são macias, parecidas com manteiga, hemisféricas e multilobulares ou são rugosas com centro amontado; apesar de não pigmentadas podem aparecer verdes devido a absorção do verde de malaquita	As colônias de um a dois dias mostram filamentos ramificados, o que não ocorre em colônias mais velhas, em ágar <i>cornmeal</i> filamentos ramificados são visíveis em colônias jovens e velhas
<i>M. kansasii</i>	As colônias são lisas ou rugosas, apesar de não pigmentada quando cultivadas na ausência de luz, tornam-se amarelo-limão quando expostas a luz por uma hora; em exposição contínua a luz, aparecem cristais vermelho-alaranjado	O centro da colônia aparece elevado e espesso; quando observadas microscopicamente porções periféricas mais finas mostram filamentos de bacilos; as colônias variam na aspereza e são muitas vezes intermediárias entre completamente lisas e completamente rugosas, mas podem ser completamente rugosas, ou raramente completamente lisas; a pigmentação é semelhante a aquela observada em meio LJ

FONTE: Adaptado de HALL, G.S.; HOWARD, B. J. Mycobacteria. In: HOWARD, B. J. **Clinical and pathogenic microbiology**. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1994. p. 512.

As características das colônias podem fornecer uma identificação presuntiva do organismo e por isso podem ser usadas para sugerir quais testes bioquímicos ou sondas de ácidos nucleicos usar para a identificação definitiva (NOLTE; METCHOCK, 1995).

FIGURA 2 – APARÊNCIA TÍPICA DE MICOBACTÉRIAS EM MEIO SÓLIDO



A, complexo *M. avium*, **B**, *M. kansasii*, **C**, *M. fortuitum*.

FONTE: FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's**: diagnostic microbiology. 3th. ed. St. Louis: Mosby, 1998. p. 732.

3.1.9.1.2 Velocidade de crescimento e temperatura

A velocidade de crescimento é o tempo requerido para colônias tornarem-se visíveis sem aumento em meio sólido. Micobactérias que formam colônias dentro de sete dias são chamadas de micobactérias de crescimento rápido, enquanto aquelas que requerem maiores períodos são chamadas de micobactérias de crescimento lento.

Algumas micobactérias de crescimento rápido podem levar mais de sete dias para crescer em meios de isolamento primário e de modo inverso, excesso de inóculo pode fazer que uma micobactéria de crescimento lento pareça ser uma micobactéria de crescimento rápido. Portanto, a velocidade de crescimento deve ser confirmada por subcultivo (NOLTE; METCHOCK, 1995). O procedimento para determinação da velocidade de crescimento encontra-se descrito em NOLTE e METCHOCK (1995) e em FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998).

O crescimento em relação a temperatura pode ser determinado pela observação da cultura primária ou subcultivo em 37° e 30°C. Quando identificação mais definitiva é necessária, os isolados devem ser incubados a 24°, 30°, 35° a 37° e 42°C (HALL, HOWARD, 1994; NOLTE, METCHOCK, 1995).

3.1.9.1.3 Pigmentação e fotorreatividade

Algumas micobactérias produzem pigmentos carotenóides sem luz, enquanto, outras requerem luz (fotoativação) para produção de pigmentos. As micobactérias são classificadas em três grupos baseado na produção de pigmentos: fotocromogênicas, escotocromogênicas e não-fotocromogênicas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

O procedimento para determinação da fotorreatividade de micobactérias encontra-se em HALL e HOWARD (1994); NOLTE e METCHOCK (1995); FORBES, SAHM e WEISSFELD (1998) e em KONEMAN *et al.* (2001).

3.1.9.1.4 Identificação bioquímica

A avaliação da morfologia das colônias, determinação da velocidade de crescimento e fotorreatividade permitem a classificação do isolado em um subgrupo e para cada subgrupo existem testes bioquímicos chaves úteis para a identificação (tabela 5) (NOLTE; METCHOCK, 1995).

TABELA 5 – TESTES BIOQUÍMICOS CHAVES PARA AUXILIAR NA DISTINÇÃO DE MICOBACTÉRIAS PERTENCENTES AO MESMO GRUPO

GRUPO	TESTES BIOQUÍMICOS CHAVES
Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Niacina, redução de nitrato, catalase a 68°C
Não-fotocromogênicas	Redução de nitrato, redução de telurito, catalase a 68°C, catalase semiquantitativa, hidrólise do Tween 80
Escotocromogênicas	Redução de nitrato, hidrólise do Tween 80, urease, crescimento em NaCl a 5%
Fotocromogênicas	Redução de nitrato, hidrólise do Tween 80, catalase semiquantitativa, uréase
Micobactérias de crescimento rápido	Arilsulfatase, redução de nitrato, incorporação de ferro, crescimento em ágar MacConkey

FONTE: NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press, 1995. p. 422.

Um painel de testes bioquímicos pode identificar a maioria das micobactérias isoladas, mas devido ao seu crescimento lento, a conclusão destes testes pode levar várias semanas. Os testes bioquímicos são baseados nas enzimas que o organismo possui e a inibição do seu crescimento em exposição a compostos selecionados.

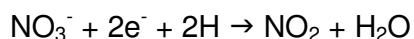
Cepas de controles de qualidade devem ser incluídas para cada teste bioquímico (VOSSLER, 2000). Os princípios destes testes são descritos abaixo. A descrição dos métodos e controles podem ser encontrados em HALL e HOWARD (1994); DELLA-LATTA e WEITZMAN (1998) e em KONEMAN *et al.* (2001).

- Acúmulo de niacina

Todas as espécies de micobactérias produzem niacina ribonucleotídeo; entretanto, virtualmente todas as cepas de *M. tuberculosis*, *M. simiae* e algumas de *M. chelonae* carecem de enzimas necessárias para a conversão posterior da niacina em nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD). Assim, a niacina acumula-se no meio de cultura, do qual pode ser extraída com água ou solução fisiológica esterilizadas. O extrato é transferido para um pequeno tubo, no qual é colocada uma tira de papel de filtro impregnada de regente para niacina (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Redução de nitrato

As micobactérias produtoras de nitrorredutase são capazes de catalisar a redução de nitratos a nitritos. Na reação, o oxigênio é retirado do nitrato segundo a fórmula:



Nitrato

Nitrito

A presença de nitritos é detectada por adição de α -naftilamina e ácido sulfanílico, com formação de um corante de diazônio vermelho, o p-sulfobenzeno-azo- α -naftilamina (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Catalase

A catalase é uma enzima capaz de degradar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A presença desta enzima é detectada pela adição de peróxido de hidrogênio a cultura teste e observação da formação de borbulhas. As espécies produtoras de catalase podem ser distinguidas por diferenças quantitativas na

atividade da catalase demonstrada na prova da catalase semiquantitativa e por diferenças na estabilidade ao aquecimento pela prova de catalase a 68°C.

- Prova da catalase semiquantitativa

Este teste divide as micobactérias em dois grupos: aquelas que produzem uma coluna de borbulhas < 45 mm (*low* catalase) e aquelas que produzem uma coluna de borbulhas > 45 mm (*high* catalase).

- Prova da catalase termoestável (68°C)

Algumas micobactérias perdem a atividade de catalase quando suspendidas em tampão pH 7,0 e aquecidas a 68°C por 20 minutos.

- Método da Catalase

A atividade da catalase pode ser avaliada rapidamente colocando-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio sobre colônias e observando-se a rápida efervescência das borbulhas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Hidrólise do Tween-80

Tween-80 é o nome comercial do detergente monoleato polioxietileno sorbitol. Algumas espécies de *Mycobacterium* possuem uma enzima que libera ácido oléico a partir do Tween-80. A mudança de cor, de laranja para rosa, é devida a hidrólise do Tween-80, que altera a rotação óptica da luz que atravessa o substrato (KONEMAN *et al.*, 2001).

Este teste é usado para separar micobactérias de crescimento lento escotocromogênicas e não-fotocromogências potencialmente patogênicas (negativas) das micobactérias geralmente saprófitas (positivas) (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Incorporação de ferro

O teste é usado para detectar micobactérias capazes de converter citrato de amônio férrico a óxido de ferro. O óxido de ferro é visível como uma coloração de ferrugem castanho avermelhada nas colônias. O meio mostra uma descoloração castanho amarelado. O teste é útil para distinguir *M. chelonae*, geralmente negativa,

de *M. fortuitum* e da maioria das outras micobactérias de crescimento rápido, que são positivas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Arilsulfatase

A arilsulfatase é uma enzima que cinde fenoltaleína livre a partir do sal tripotássico de dissulfito de fenoltaleína. A prova para identificação de espécies de *Mycobacterium* é realizada em tubo contendo substrato de fenoltaleína em ágar ácido oléico (Wayne). Após 3 (ou 14) dias de incubação de um subcultivo da espécie desconhecida, o desenvolvimento de cor vermelha após adição de carbonato de sódio indica reação positiva (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Pirazinamidase

A enzima pirazinamidase hidrolisa a pirazinamida a ácido pirazinóico. Este ácido é detectado pela adição de sulfato de amônio ferroso no meio de cultura. A formação de um complexo ácido pirazinóico-ferroso rosa indica um teste positivo. Este teste é útil na separação de *M. marinum* de *M. kansasii* e *M. bovis* de *M. tuberculosis*. *M. bovis* é negativa mesmo em sete dias, enquanto *M. tuberculosis* é positiva dentro de quatro dias (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Urease

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de *Mycobacterium*, que podem hidrolisar uréia para formar amônia e dióxido de carbono. A amônia reage em solução, formando carbonato de amônio e produzindo alcalinização e aumento do pH do meio (KONEMAN *et al.*, 2001).

O teste é útil na identificação de micobactérias escotocromogênicas e não-fotocromogênicas. *M. scrofulaceum* é urease positiva, enquanto membros do complexo *M. avium* são urease negativos (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Inibição do crescimento por hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico

A hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (T₂H) inibe o crescimento de *M. bovis*, mas não o de outras espécies de micobactérias, característica útil para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Crescimento em cloreto de sódio a 5%

M. triviale é a única micobactéria de crescimento lento que cresce em meios com 5% de NaCl. Espécies de crescimento rápido patogênicas, exceto *M. mucogenicum* e a maioria dos isolados de *M. chelonae*, crescem em meios com 5% de NaCl (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Prova NAP (p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona); (BACTEC)

Os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* não crescem em presença de p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP). Cada frasco de BACTEC contém 5 μ g de NAP. Quando nesse frasco é adicionado 1 ml do cultivo de um membro do complexo *M. tuberculosis*, em crescimento ativo em meio 12B, seu desenvolvimento é inibido. As micobactérias não-tuberculosas não sofrem significativa inibição de crescimento. A ocorrência de crescimento é indicada pelo detector de radioatividade do instrumento por monitoração da produção de ¹⁴CO₂, cuja ausência (falta de aumento no índice de crescimento) é compatível com o complexo *M. tuberculosis* (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Crescimento em ágar MacConkey

A capacidade de crescimento em ágar MacConkey especial, formulado sem cristal violeta, diferencia *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que podem desenvolver-se em cinco dias, de outras micobactérias de crescimento rápido, que apresentam apenas um leve crescimento em 11 dias (KONEMAN *et al.*, 2001).

- Redução de telurito

A redução de telurito de potássio incolor a telúrio metálico preto em três a quatro dias é uma característica do complexo *M. avium* e, portanto, é útil para distinguir o complexo *M. avium* de outras espécies não-cromogênicas. Além disso, todas as espécies de crescimento rápido são capazes de reduzir telurito em três dias (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 1998; VOSSLER, 2000).

3.1.9.2 Cromatografia

A parede celular das micobactérias contém ácidos graxos de cadeia longa chamados ácidos micólicos que podem ser detectados cromatograficamente (VOSSLER, 2000). Em micobactérias os ácidos micólicos contêm 60 ou mais carbonos (DUFFEY; GUTHERTZ; EVANS, 1996). Evidências mostram que os ácidos micólicos em micobactérias são espécie-específicos (BUTLER; JOST; KILBURN, 1991). A identificação cromatográfica de micobactérias tem sido objeto de interesse há muito tempo e os métodos são alterados conforme a tecnologia evolui. Métodos empregados no início, como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada, foram substituídas pela cromatografia líquido-gasosa e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os métodos correntes permitem fácil extração de suficiente quantidade de ácidos micólicos a partir de pequenas quantidades de bactérias (VOSSLER, 2000). A identificação de espécies de micobactérias por HPLC tem mostrado concordância com a identificação bioquímica e por sondas. Em um estudo, THIBERT e LAPIERRE (1993) mostraram que a HPLC identificou 96,1% de 1103 isolados, enquanto os testes bioquímicos e/ou sondas de DNA identificaram 98,3% dos isolados. Em um outro estudo, GUTHERTZ *et al.* (1993) demonstraram uma concordância de 97,2% em 502 culturas de micobactérias e comparando os padrões cromatográficos com sondas de DNA para 111 culturas demonstraram concordância de 98,2%.

Fazendo uma comparação entre HPLC e os métodos moleculares, o processamento das amostras em HPLC é rápido e fácil, mas, para reprodutibilidade dos padrões cromatográficos, condições padronizadas de crescimento devem ser

usadas. A HPLC necessita de mais biomassa celular que os métodos moleculares. Os métodos moleculares possuem sensibilidade de detecção maior que a HPLC. Ambos os métodos, HPLC e seqüenciamento automatizado requerem instrumentação sofisticada e custosa. Em HPLC uma única amostra pode ser processada em duas horas, enquanto o seqüenciamento automatizado requer mais de oito horas (BUTLER; GUTHERTZ. 2001).

3.1.9.3 Análise do perfil plasmidial

Uma das primeiras ferramentas moleculares usadas para auxiliar a diferenciação de micobactérias de crescimento rápido foi a análise do perfil plasmidial. Sondas de DNA com uma sonda associada a plasmídio têm sido um guia útil para a comparação de cepas. A variabilidade genética de plasmídios pode ser estudada por RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição) de plasmídios ou hibridização com seqüências definidas ou repetitivas. Porém, estes métodos por se concentrarem no DNA extracromossômico, não fornecem evidências conclusivas que cepas são relacionadas. Isolados com perfil plasmidial semelhante podem pertencer a diferentes grupos biovariantes e vice-versa. Portanto, o uso do perfil plasmidial para a identificação de espécies é de valor limitado, visto que alguns isolados de micobactérias de crescimento rápido não contêm plasmídios detectáveis, o perfil de plasmídios pode mudar com o tempo e plasmídios completamente diferentes podem ser do mesmo tamanho. Geralmente, outros métodos que se focam no DNA cromossômico substituíram esta análise (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

3.1.9.4 Sondas de DNA

Sondas de DNA comerciais (AccuProbe; Gen-Probe, Inc, San Diego, Califórnia, USA) são disponíveis para a identificação de algumas espécies de micobactérias importantes clinicamente, incluindo complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, complexo *M. avium*, *M. kansasii* e *M. goodii*. Os testes são baseados em sondas de DNA espécie-específicas que hibridizam com o RNA

ribossômico liberado da bactéria. As sondas são marcadas com éster de acridina e os resultados são medidos com um luminômetro. Para as amostras de cultura positiva, o tempo de análise é de aproximadamente duas horas (CHEMLAL; PORTAELS, 2003).

A sensibilidade de reconhecimento é cerca de 10^4 microrganismos por mililitro. É estimado que 10^5 a 10^7 microrganismos por mililitro são requeridos para a detecção por Gen-Probe. De acordo com o fabricante, 3 a 6×10^8 microrganismos por mililitro são requeridos. Quando uma sonda é usada em uma amostra contaminada ou houver falhas na etapa de lise das micobactérias, podem ocorrer resultados falso-negativos (NOLTE, METCHOCK, 1995; VOSSLER, 2000).

As sondas não permitem a diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis*. Relatos indicaram que alguns isolados de *M. terrae* e complexo *M. celatum* produziram reações falso-positivas com as sondas do complexo *M. tuberculosis* (NOLTE; METCHOCK, 1995).

A identificação por hibridização do DNA pode ser aplicada em cultivo em ágar convencional, meio líquido ou em sistema radiométrico como BACTEC. A combinação da detecção radiométrica e identificação por hibridização de DNA usando sondas permite rápida recuperação e identificação (VOSSLER, 2000).

Outro *kit* disponível é INNO-LIPA Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Belgium). A análise é baseada na hibridização reversa, na qual a região intergência 16S-23S RNAr (RNA ribossômico) é amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e os produtos de PCR são subseqüentemente hibridizados com várias sondas para várias espécies de micobactérias (CHEMLAL; PORTAELS, 2003). A versão 1 inclui sondas para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, *M. kansasii* (grupo I, II e III), *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. chelonae* (grupo I, II e III) e MAC (designado complexo MAIS por incluir *M. scrofulaceum*) com sondas espécie-específicas para *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*. A versão 2 possui sondas para *M. celatum*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. smegmatis* e a sonda MIN-2 específica para *M. intracellulare* *sequevar* Mac-A (LEBRUN *et al.*, 2005).

3.1.9.5 Detecção direta de *M. tuberculosis*

A entidade americana Food and Drug Administration (FDA) aprovou duas técnicas moleculares para a detecção direta de *M. tuberculosis* em amostras clínicas: Amplicor *M. tuberculosis* test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) e Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego, CA).

A técnica Amplicor test detecta a presença do gene 16S RNAr por PCR seguido por uma reação de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O tempo de análise é de 6.5 horas e uma versão automatizada chamada de Cobas Amplicor é disponível. A técnica é aprovada apenas para amostras respiratórias com esfregaço positivo para bacilos ácido-resistentes. Apresenta especificidade de 99% e sensibilidade de 80 a 92%.

A técnica E-MTD é baseada na amplificação mediada por transcrição (TMA). O RNAr micobacteriano é liberado das células por sonicação e amplificado por TMA. O tempo de análise é de 3.5 horas. Seu uso é aprovado para amostras respiratórias com esfregaço negativo ou positivo para bacilos ácido-resistentes. A comparação entre E-MTD e Amplicor mostrou desempenho semelhante na detecção de *M. tuberculosis* (HAZBÓN, 2004).

3.1.9.6 PCR-seqüenciamento

O seqüenciamento de fragmentos baseado na PCR tornou-se o método “padrão ouro” para a identificação de micobactérias. O método consiste na amplificação por PCR do DNA micobacteriano com *primers* específicos ao gênero seguido do seqüenciamento dos produtos de PCR. O organismo é identificado por comparação da seqüência de nucleotídeos com seqüências de referência (CHEMLAL; PORTAELS, 2003).

O alvo mais usado é o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (16S DNAr) (SOINI, VILJANEN, 1997; CHEMLAL, PORTAELS, 2003; LEE *et al.*, 2003).

O gene 16S RNAr é altamente conservado mas, contém variações de sequência gênero ou espécie-específica em certas posições. A análise da sequência tornou-se uma ferramenta útil para a identificação e análise filogenética de bactérias e pode conduzir a descoberta de organismos não cultiváveis e espécies previamente não caracterizadas (HOLBERG-PETERSEN *et al.*, 1999).

KIRSCHNER *et al.* (1993) realizaram a identificação de micobactérias isoladas de amostras clínicas pela determinação da sequência das regiões hipervariáveis A e B do gene 16S RNAr amplificadas por PCR. Os membros do complexo *M. tuberculosis* produziram idênticas seqüências. *M. kansasii* e *M. gastri* não foram diferenciadas e o mesmo aconteceu com *M. ulcerans* e *M. marinum*. Mas, diferenças na sequência que ocorrem além destas duas regiões permitiriam a diferenciação entre *M. ulcerans* e *M. marinum*. Entre as micobactérias de crescimento rápido, *M. chelonae* subsp. *chelonae* e *M. chelonae* subsp. *abscessus* não foram distinguidas dentro das regiões A e B, mas, diferem em outras posições do gene 16S RNAr. *M. gordonae* mostrou variabilidade intraespécie. A sequência do gene 16S RNAr de *M. leprae* também é descrita, sendo que a mesma foi obtida da publicação de TESKE, WOLTERS e BÖTTGER (1991).

Segundo ROTH *et al.* (1998) o número de sítios polimórficos no gene 16S DNAr no gênero *Mycobacterium* é pequeno, visto que algumas espécies possuem a mesma sequência (*M. kansasii* e *M. gastri* ou *M. senegalense* e *M. farcinogenes*) e outras possuem alto grau de similaridade de sequência (*M. malmoense* e *M. szulgai* ou *M. marinum* e *M. ulcerans*).

HOLBERG-PETERSEN *et al.* (1999) identificaram cepas de referência e isolados clínicos por análise da sequência das regiões A e B do gene 16S RNAr amplificadas por PCR. Dois clínicos isolados produziram seqüências incompatíveis com as seqüências publicadas. De 323 isolados identificados como micobactérias de crescimento lento por técnicas convencionais (características de cultura, testes bioquímicos, sondas de DNA comerciais e perfil lipídico), 318 (98,5%) foram identificados a mesma espécie ou grupo por análise da sequência do gene 16S DNAr. Dois isolados identificados como MAC (complexo *M. avium*, formado por *M. avium* e *M. intracellulare*) por métodos convencionais foram identificados como *M. terrae* por análise da sequência. O complexo *M. avium* e *M. terrae* são distinguidos

por testes bioquímicos e a análise retrospectiva revelou que os dois isolados deveriam ter sido identificados como *M. terrae*. Um isolado identificado convencionalmente como *M. scrofulaceum* revelou uma seqüência 16S DNAr semelhante a *M. novocastrense*. Estes dois organismos são facilmente identificados pela velocidade de crescimento, perfil lipídico e testes bioquímicos. Análise retrospectiva revelou que a discrepância foi provavelmente devido a interpretação bioquímica errada. Dois isolados de crescimento rápido não foram identificados por testes convencionais. O complexo *M. tuberculosis* exibiu idêntica seqüência 16S DNAr. As espécies do complexo podem ser distinguidas por características fenotípicas. Do mesmo modo, *M. gastri* e *M. kansasii* mostraram idêntica seqüência, mas, são diferenciadas pelo perfil lipídico, fotocromogenicidade, atividade de catalase e redução de nitrato. Membros do MAC são bioquimicamente indistinguíveis, mas, podem ser diferenciados por métodos moleculares. Membros de MAIS (complexo *M. avium/intracellulare/scrofulaceum*) não são diferenciados por perfil lipídico, mas, *M. scrofulaceum* é escotocromogênica e MAC é não-fotocromogênica. A análise da seqüência 16S DNAr combinada com algumas características de cultura como, velocidade de crescimento, pigmentação, testes de suscetibilidade, oferece uma rápida, reproduzível e geralmente, identificação definitiva de isolados de micobactérias.

Conforme KIM *et al.*, (1999) resultados ambíguos devido a presença de dois genes 16S RNAr diferentes em um organismo pode limitar o uso do seqüenciamento deste alvo na identificação de espécies.

PATEL *et al.* (2000) avaliaram o sistema comercial MicroSeq 500 (PE Applied Biosystems) para a identificação de micobactérias. Este sistema de identificação bacteriano é universal, pois os *primers* usados são genéricos para todas as bactérias. O sistema se baseia na amplificação por PCR de um fragmento de 500 pb (pares de base) da extremidade 5' do gene 16S RNAr a partir de culturas puras seguido do seqüenciamento. O organismo é identificado por comparação da seqüência 16S DNAr com o banco de dados MicroSeq, que consiste de seqüências de referência. No estudo, 82% (93/113) dos isolados apresentaram resultados concordantes com a identificação por sondas de DNA, testes bioquímicos ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e 16% (18/113) dos isolados

apresentaram resultados discordantes com a identificação original. MicroSeq 500 subdividiu os isolados do complexo *M. avium-intracellulare* em duas espécies. Todos os isolados previamente agrupados no complexo *M.terrae-triviale* foram identificados como *M. nonchromogenicum*. Outros estudos relataram que a maioria dos isolados informados como complexo *M. terrae-triviale* são verdadeiramente *M. nonchromogenicum*. Um isolado originalmente relatado como *M. fortuitum* foi identificado como *M. peregrinum*, a qual foi previamente classificada como uma subespécie de *M. fortuitum*. O sistema não diferenciou as espécies do complexo *M. tuberculosis*. Do mesmo modo, o sistema foi insuficiente para distinguir entre *M. chelonae* e *M. abscessus*, entre *M. genavensae* e *M. simiae* e entre *M. kansasii* e *M. gastri*. A sequência inteira 16S DNAr é idêntica para *M. genavensae* e *M. simiae*, assim como para *M. kansasii* e *M. gastri*. Existem diferenças na sequência 16S DNAr entre *M. chelonae* e *M. abscessus*, mas, ocorrem na região 5' do gene.

Os 18 isolados com resultados discrepantes foram agrupados em duas categorias: (1) espécies freqüentemente encontradas, que foram erroneamente identificadas pela identificação fenotípica ou por sondas e (2) espécies raramente isoladas, que são difíceis de identificar por métodos fenotípicos. Dois isolados não foram identificados por características fenotípicas, mas, o sistema MicroSeq foi capaz de identificar um desses isolados. A identificação fenotípica incorreta provavelmente resultou da variação fenotípica dentro de uma espécie e da falta de experiência entre técnicos que realizaram e leram os testes bioquímicos.

Segundo TURENNE *et al.* (2001) métodos de identificação baseados no seqüenciamento do DNA ribossomal (DNAr) 16S são mais rápidos e mais corretos que os métodos convencionais. Além da identificação, a técnica é empregada para a caracterização de novas espécies. Apesar dos problemas associados, muitas pessoas confiam em bancos de dados públicos para a comparação de seqüências. Porém, bancos de dados de qualidade controlada como fornecido por RIDOM (*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganismos*), que por sua vez é disponível livremente na *internet*, é essencial para a identificação correta de espécies e detecção de variações de seqüência conduzindo a descoberta de novas espécies.

HAN *et al.* (2002) desenvolveram um método de identificação por amplificação e seqüenciamento de um fragmento de 650 pb que compreende as regiões hipervariáveis A e B do gene 16S DNAr. Houve 87% de concordância com sondas de ácidos nucleicos e testes bioquímicos e 13% de identificações discordantes. As identificações discordantes foram encontradas ser espécies recentemente propostas e estreitamente relacionadas. Ocasionalmente, correlação com algumas características de cultura podem ser necessárias para diferenciar espécies com seqüência 16S DNAr idênticas, como *M. kansasii* e *M. gastri*, *M. chelonae* subsp. *chelonae* e *M. chelonae* subsp. *abscessus*, que não foram diferenciadas, mas, podem ser identificadas por testes bioquímicos ou PCR e seqüenciamento de aproximadamente 500 pb *downstream* usando *primers* universais.

Conforme RINGUET *et al.* (1999) o gene 16S RNAr possui valor para a identificação de micobactérias de crescimento lento, pois há pouca variabilidade dentro dessa seqüência em micobactérias de crescimento rápido. O gene *hsp65*, o qual está presente em todas as micobactérias, é mais variável que a seqüência do gene 16S RNAr e portanto, potencialmente útil para a identificação de espécies geneticamente relacionadas. A variação na seqüência do gene *hsp65* pode ser explorada para a identificação de micobactérias de crescimento lento e rápido.

O potencial do seqüenciamento de 441 pb do gene *hsp65* para a identificação de micobactérias de crescimento rápido foi avaliado. Dez cepas de referência foram investigadas, entre elas quatro principais espécies responsáveis por infecções em humanos, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. peregrinum*, e cada espécie apresentou uma seqüência de nucleotídeos, que permitiu a diferenciação. No estudo, foi observado algum grau de diversidade alélica intraespécie, o que foi coerente com os resultados de estudos prévios. Esta diversidade é mais baixa que a divergência interespecie e não afetou a identificação das espécies. O efeito da diversidade alélica na seqüência de aminoácidos foi também estudado. A maioria das substituições de nucleotídeos conduziu a mudanças que foram conservativas ou codificaram aminoácidos semelhantes funcionalmente. Esta observação suporta a teoria que a proteína Hsp65 é altamente conservada entre as micobactérias.

KIM *et al.* (2005) analisaram uma sequência de 604 pb do gene *hsp65* de 56 espécies de micobactérias de referência e de 105 isolados clínicos após a amplificação de um fragmento de 644 pb. Mais de 83,1% de similaridade foi observado entre as sequências. *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* e *M. tuberculosis* apresentaram sequências idênticas. A sequência de *M. simiae* ATCC 25275 e *M. genavense* ATCC 51233 também foi idêntica. A similaridade entre cepas de cada espécie foi maior que 98,2%. Entre as cepas de referência estava a cepa *M. leprae* Thai-53 e entre os 105 isolados clínicos havia 16 amostras de biópsias obtidas de lesões de pacientes com hanseníase. Os 16 isolados de *M. leprae* apresentaram sequências idênticas. Quando o protocolo foi aplicado a 70 isolados clínicos, com análise de apenas 422 pb do fragmento de 644 pb, todos os isolados foram identificados. Comparando com a análise de sequência do gene 16S RNAr, a análise do gene *hsp65* permitiu a separação entre *M. abscessus* e *M. chelonae*, entre *M. szulgai* e *M. malmoense* e entre *M. kansasii* e *M. gastri*, o que não é alcançado com a análise do gene 16S RNAr. Além disso, PCR-RFLP usando *Xho* I promoveu a diferenciação do complexo *M. tuberculosis* de espécies de micobactérias não tuberculosas e a separação das micobactérias não tuberculosas em cinco grupos.

Além do gene 16S DNAr e *hsp65*, outros genes foram caracterizados para a identificação de micobactérias, pelo método PCR-sequenciamento, como gene que codifica uma proteína de 32 KDa, gene *gyrA*, gene *gyrB*, gene *rpoB*, ITS, gene *recA*, gene *dnaJ* e gene *secA1*.

O gene que codifica uma proteína de 32 KDa é específico para micobactérias e existem variações na sua sequência entre as espécies de micobactérias. SOINI, BÖTTGER e VILJANEN (1994) determinaram a sequência de um fragmento de 423 pb do gene que codifica a proteína de 32 KDa por PCR-sequenciamento. Um total de dez espécies foi estudado. Os membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. microti*) não foram distinguidos. Estas espécies são diferenciadas por métodos bioquímicos. A sequência de *M. avium-intracellulare* foi diferente uma da outra. *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. gordonae* e *M. malmoense* apresentaram uma sequência espécie-específica única.

Em um estudo posterior SOINI e VILJANEN (1997) utilizaram a mesma metodologia para 18 outras espécies, incluindo *M. gordonae*. Em dez casos, todos os isolados da mesma espécie apresentaram seqüências idênticas e variabilidade intraespécie foi encontrada em seis casos (*M. asiaticum*, *M. smegmatis*, *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. triviale* e *M. celatum*).

De acordo com a análise da seqüência do DNA ribossomal 16S, *M. celatum* pode ser dividido em dois grupos. A seqüência do gene da proteína de 32 KDa de *M. celatum* tipo I e tipo II foram também encontradas ser levemente diferentes uma da outra. Portanto, os dados suportam a presença de dois tipos de *M. celatum*. *M. branderi* e *M. celatum* apresentaram diferentes seqüências, porém suas seqüências são semelhantes, sugerindo que as espécies são relacionadas.

A análise da seqüência de nucleotídeos da região conservada na subunidade A da DNA girase por GUILLEMIN, CAMBAU e JARLIER (1995) resultou na diferenciação de nove espécies de micobactérias, incluindo *M. leprae*, a qual foi obtida de tecido de camundongo.

A DNA girase é uma topoisomerase tipo II e é a enzima essencial para o superenrolamento do DNA, a qual é requerida para a replicação e transcrição do DNA. Duas subunidades A e duas subunidades B codificadas pelo gene *gyrA* e *gyrB*, respectivamente, formam a enzima tetramérica ativa. A estrutura primária da subunidade A e B da DNA girase são conservadas entre procariotos, provavelmente devido a função essencial da enzima. Além disso, um domínio N-terminal da subunidade A é altamente conservado entre procariotos e entre procariotos e eucariotos. Este domínio contém o sítio catalítico da enzima e a região determinante de resistência a quinolonas (QRDR), o qual é suposto ser o sítio de interação entre a subunidade A da DNA girase e quinolonas. As quinolonas são ativas no tratamento da tuberculose e hanseníase, mas recidivas devido a seleção de mutantes resistentes podem ocorrer durante o tratamento com quinolonas. Em *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. smegmatis*, mutações afetando a subunidade A da DNA girase (especialmente códons 83 e 87) e mutações associadas com resistência adquirida a quinolonas foram descritas.

No estudo realizado, observou-se alto grau de conservação na seqüência de nucleotídeos da QRDRs das nove espécies de micobactérias, mas a análise das diferenças entre as espécies permitiu a diferenciação das mesmas.

M. tuberculosis e *M. bovis* BCG apresentaram uma homologia de seqüência de 98,3%, mas como algumas cepas de *M. tuberculosis* foram relatadas possuir seqüência idêntica a aquela de *M. bovis* BCG, a diferença encontrada entre as duas espécies (um G por um C na posição 284) é provavelmente devido ao polimorfismo natural descrito previamente em *M. tuberculosis* e não pode ser usado para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis* BCG (GUILLEMIN; CAMBAU; JARLIER, 1995).

DAUENDORFFER *et al.* (2003) avaliaram o seqüenciamento do produto de PCR das QRDRs dos genes *gyrA* e *gyrB* para a diferenciação de 21 espécies de micobactérias, incluindo isolados clínicos de *M. leprae*.

As seqüências de nucleotídeos da QRDR do gene *gyrA* (120 pb) e da QRDR do gene *gyrB* (117 pb) foram altamente conservados entre as cepas testadas, os valores de similaridade variaram entre 75 e 100% para QRDR do gene *gyrA* e 79 a 100% para QRDR do gene *gyrB*. As seqüências de nucleotídeos de *gyrA* e *gyrB* foram comparadas para todas as espécies e para todas as cepas dentro de cada espécie.

A comparação interespecie mostrou que as seqüências de QRDR do gene *gyrA* (120 pb) e do gene *gyrB* foram espécie-específicas. Espécies que são estreitamente relacionadas por suas características fenotípicas e bioquímicas ou seqüência ribossomal apresentaram diferenças na seqüência da QRDR do gene *gyrA* (120 pb) e do gene *gyrB*. Por exemplo, *M. kansasii* e *M. gastri*, *M. szulgai* e *M. malmoense*, *M. avium* e *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. szulgai* e *M. aurum* foram diferenciadas. O grupo *M. chelonae* (*M. chelonae* e *M. abscessus*) e o grupo *M. fortuitum* (*M. fortuitum* e *M. peregrinum*) foram distinguidos, assim como as duas espécies dentro cada grupo. As espécies que pertencem ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis*) não foram diferenciadas. *M. marinum* e *M. ulcerans* também não foram diferenciadas. Os maiores valores de similaridade apresentados por *M. leprae* foram 86,7% com *M. intracellulare* para a seqüência da QRDR do gene *gyrA* e 83,8% com *M. marinum* para a seqüência da QRDR do gene *gyrB*.

A similaridade intraespécie variou de 97,5 a 100%. Diferenças na sequência foram raramente observadas entre as cepas da mesma espécie, com exceção de mutantes resistentes a fluoroquinolonas. A diferença intraespécie foi considerada um polimorfismo natural de sequência.

KIM *et al.* (1999) realizaram a identificação de 44 cepas de referência, incluindo *M. leprae*, pela análise da sequência de um fragmento de 342 pb do gene *rpoB*. Este gene codifica a subunidade β da RNA polimerase. Foram observados 85 a 100% de similaridade entre as espécies micobacterianas. Os membros do complexo *M. tuberculosis* apresentaram seqüências idênticas. *M. kansasii* foi diferenciada de *M. gastri*. *M. haemophilum* foi a espécie mais semelhante a *M. leprae*. *M. szulgai* foi separada de *M. malmoense*, assim como, *M. intracellulare* foi distinguida de *M. avium*. Quando a técnica foi aplicada aos 113 isolados clínicos observaram-se variações na sequência de nucleotídeos entre as cepas de cada espécie (99 a 100% de similaridade). Variantes de *M. tuberculosis* foram encontrados apenas entre cepas resistentes a rifampicina. Seis isolados de *M. leprae* obtidos de biópsia de pele foram corretamente identificados e todos apresentaram 100% de similaridade. Segundo os autores, a análise da sequência do gene *rpoB* pode ser usada eficientemente para a identificação de isolados clínicos e micobactérias em paralelo com métodos de cultura tradicionais e como um complemento da análise do gene 16S DNAr.

ADÉKAMBI, COLSON e DRANCOURT (2003) realizaram a análise da sequência do gene *rpoB* inteiro para 20 cepas de micobactérias de crescimento rápido de referência a fim de melhorar a identificação baseada na sequência desse grupo de patógenos emergentes. Foram observadas cinco regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas: região I, II, III, IV e V. A região III inclui a região de identificação descrita por KIM *et al.* (1999) e a região V apresentou maior variabilidade.

A sequência completa do gene *rpoB* foi mais variável que a sequência do gene 16S RNAr. As seqüências *rpoB* variaram de 84,3 a 96,6% (excluindo "*M. houstonense*"), enquanto, para o gene 16S RNAr a variação foi de 95,7 a 99,7%. Este achado sugere que o *rpoB* pode aumentar a discriminação molecular de micobactérias de crescimento rápido. Além disso, a porcentagem de homologia

interespecie e intraespecie para o gene *rpoB* inteiro foi de 84,3 a 96,6% e 98,2 a 99,9%, respectivamente e aquelas para o gene *rpoB* parcial (723 pb), sequência incluída na região V, foi de 83,9 a 97% e 98,3 a 100%, respectivamente. Isto sugere que a região de 723 pb do gene *rpoB* é uma boa escolha para uso na identificação.

O método foi utilizado para a identificação de 63 isolados clínicos previamente identificados por características fenotípicas e análise da sequência do gene 16S RNAr. Dos 63 isolados 59 (94%) foram corretamente identificados. *M. abscessus* e *M. mucogenicum* foram distinguidos de *M. chelonae*; *M. magaritense* foi diferenciada de "*M. houstonense*". Quatro isolados não foram identificados e foram suspeitados ser três novas espécies, pois cada um possuía consistentes sequência genética e padrão bioquímico.

Os genes codificantes para o RNAr estão arranjados na ordem 5'-16S-23S-5S-3' e são separados por duas regiões espaçadoras. A sequência intergência (ITS)16S-23S DNAr é sugerida como um alvo potencial dentro do genoma bacteriano para encontrar sítios para sondas e das quais obter informações filogenéticas adicionais (ROTH *et al.*, 1998).

ROTH *et al.* (1998) investigaram a utilidade do ITS para a identificação de micobactérias. A sequência de 13 espécies foi determinada.

Observou-se alto grau de variabilidade em toda a sequência e como resultado desta variabilidade, verificou-se polimorfismo de sequência intraespecie em quatro de 11 espécies para as quais múltiplas cepas dentro de uma espécie foram analisadas, estas espécies são: *M. gastri*, *M. avium*, *M. simiae* e *M. xenopi*. *M. triplex* e *M. genavense* foram as duas espécies que apresentaram mais alto grau de similaridade de sequência (96%). *M. marinum* e *M. ulcerans* apresentaram a mesma sequência ITS, assim como os membros do complexo *M. tuberculosis*.

Baixos níveis de similaridade foram obtidos com a sequência ITS do que com a sequência 16S DNAr. *M. kansasii* e *M. gastri* apresentaram 92 a 93% de similaridade e *M. malmoense* e *M. szulgai* apresentaram 88% de similaridade, enquanto, a similaridade encontrada com a sequência 16S DNAr para estas espécies foi maior que 99%.

O estudo demonstrou que a região ITS do gênero *Mycobacterium* exibiu variações e mostrou um razoável número de substituições e inserções ou sítios de

deleções. Este alto grau de variações é de valor para a discriminação de espécies estreitamente relacionadas como *M. gastri* e *M. kansasii*.

Os resultados mostraram que o seqüenciamento da região ITS representa um complemento para a análise da seqüência do gene 16S RNAr e a variação apresentada na seqüência ITS tem potencial para ser usado no desenvolvimento de sondas como um acesso rápido para a identificação de micobactérias.

BLACKWOOD *et al.* (2000) utilizaram o gene *recA* como um alvo para identificação de micobactérias. O gene *recA* existe em todas as bactérias devido sua importante função na recombinação de DNA homólogo, reparo de danos no DNA e indução da resposta SOS. Os genes *recA* de 31 espécies de micobactérias foram estudadas, incluindo *M. leprae*, cuja seqüência foi obtida do *GenBank*.

O seqüenciamento do gene *recA* mostrou menor grau de similaridade interespecie do que a análise da seqüência do gene 16S RNAr (94,3-100%), variando de 96,2% entre *M. gastri* e *M. kansasii* a 75,7% entre *M. aurum* e *M. leprae*. Exceção disso foram os membros do complexo *M. tuberculosis* que apresentaram seqüências idênticas. Duas cepas de cada 27 espécies foram testadas e a similaridade intraespécie variou de 98,7 a 100%. Porém a comparação de duas cepas de *M. peregrinum* resultou em 96,2% de similaridade. A seqüência de gene 16S RNAr destas duas espécies foram determinadas e indicaram 100% de similaridade. Os autores acreditam que o seqüenciamento do gene *recA* possa ser usado em combinação com a análise da seqüência do gene 16S RNAr para a correta identificação de micobactérias.

TAKEWAKI *et al.* (1994) determinaram a seqüência de nucleotídeos do segmento do gene *dnaJ* de 19 espécies obtidos por PCR. Os autores observaram que existiam diferenças na seqüência entre as espécies e essas diferenças poderiam ser úteis na distinção das mesmas. As espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti*) apresentaram seqüências idênticas. Diferenças na seqüência neste complexo possibilitaram a distinção entre o complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas. *M. avium* e *M. intracellulare* mostraram uma grande similaridade de seqüência (94%). *M. avium* e *M. paratuberculosis* foram quase idênticas (99%). *M. kansasii* e *M. gordonae* apresentaram o mais baixo grau de similaridade (62%).

ZELAZNY *et al.* (2005) demonstraram que o fragmento de 700 pb do gene *secA1* pode ser usado para a identificação de micobactérias. Este gene codifica uma proteína essencial SecA1, componente chave na secreção de proteínas através da membrana plasmática. O fragmento do gene *secA1* foi amplificado e seqüenciado para 30 espécies de micobactérias, incluindo *M. leprae*, cuja seqüência do gene foi obtida do *GenBank*. A variabilidade na seqüência permitiu a diferenciação de todas as espécies, exceto os membros do complexo *M. tuberculosis*, que apresentaram seqüências idênticas. Espécies estreitamente relacionadas como *M. gastri* e *M. kansasii*, *M. chelonae* e *M. abscessus* e *M. marinum* e *M. ulcerans* foram diferenciadas. A similaridade interespecie variou de 83,3 a 100%. Embora os *primers* usados no estudo também amplificaram o gene *secA1* de duas espécies de *Nocardia* testadas, o seqüenciamento permitiu a diferenciação entre estas espécies e todas as espécies de micobactérias testadas. A divergência intraespécie foi menor que 1,0% (>99% de similaridade), exceto em três casos. Duas cepas de referência de *M. celatum* (ATCC 51131 e ATCC 51130) mostraram 95,7 % de similaridade. A análise da seqüência de três cepas de referência de *M. triviale* mostrou que duas cepas (ATCC 23290 e ATCC 23291) foram quase idênticas (99,9% de similaridade), mas, foram divergentes daquela da *type strain* (91,9 e 91,7% de similaridade, respectivamente). A porcentagem de similaridade entre três cepas de referência de *M. flavescens* foi baixa, duas cepas (ATCC 23008 e ATCC 23033) pareceram mais relacionadas uma a outra (96,3% de similaridade) do que com a *type strain* (91,0 a 90,4% de similaridade). As cepas *M. flavescens* (ATCC 23008) e ATCC 23033) pareceram mais relacionadas com *M. smegmatis type strain*. As seqüências de isolados clínicos pertencentes a nove espécies revelaram uma similaridade intraespécie de 96 a 100% e todas foram corretamente identificadas. A maior variabilidade intraespécie foi observada com *M. kansasii* e *M. gordonae*.

3.1.9.7 PCR-RFLP

Neste método, um gene ou um segmento do gene é amplificado por PCR, o produto é clivado com endonucleases de restrição e os fragmentos são analisados

em gel de agarose ou de poliacrilamida ou por eletroforese capilar (HERNANDEZ *et al.*, 1999).

As técnicas de PCR-RFLP foram desenvolvidas para vários genes micobacterinaos como *hsp65*, região intergência 16S-23S DNAr (ITS) e *rpoB*. Destes o mais investigado e validado é o gene *hsp65* (WONG *et al.*, 2001). Além destes genes, outros foram usados como gene *gyrB*, gene para 16S RNAr, região promotora do gene 16S RNAr e gene *dnaJ*.

TELENTI *et al.* (1993) desenvolveram um método de identificação baseado na amplificação por PCR de um fragmento de 439 pb do gene *hsp65* seguido da digestão do produto de PCR com as enzimas de restrição *Bst* EII e *Hae* III. Foram investigadas 31 espécies de referência para a construção de um algoritmo. Os membros do complexo *M. tuberculosis* não foram diferenciados. O complexo *M. avium-intracellulare* foi discriminado em *M. avium* e *M. intracellulare*. *M. avium-intracellulare* ATCC 35770 sorotipo 18 revelou um padrão RFLP de *M. intracellulare*. O complexo *M. fortuitum* foi separado em subespécies. *M. kansasii* e *M. gastri* exibiram distintos perfis. *M. gordonae* foi separada em cinco padrões e *M. flavescens* produziu dois diferentes padrões.

TAYLOR *et al.* (1997) inicialmente, aplicaram o método desenvolvido por TELENTI *et al.* (1993) para a identificação de 28 espécies de micobactérias de referência e, posteriormente, para a identificação de isolados clínicos obtidos de meio líquido. Os testes demonstraram que os padrões de restrição foram facilmente interpretados e concordavam com aqueles obtidos previamente, porém, exceções foram observadas. Estas envolviam variações pequenas no tamanho de vários fragmentos de restrição, observação de fragmentos antes não relatados e a inabilidade de observar o fragmento de 115 pb de *M. haemophilum* ATCC 29548. Além disso, *M. nonchromogenicum* e *M. simiae* apresentaram dois subtipos (I e II), um novo padrão para *M. gordonae* foi nomeado VI para diferenciação dos cinco padrões descritos previamente, padrões de restrição para *M. chelonae presumptive* e para *M. neoarum* foram relatados. Baseado nas observações, um novo algoritmo foi construído. Um produto de 439 pb foi obtido de dois isolados, *Streptomyces albus* e *Rhodococcus equi*, e a análise do perfil de restrição demonstrou que ambos os

padrões foram distinguíveis daqueles dos fragmentos produzidos pelas micobactérias.

DEVALLOIS, GOH e RASTOGI (1997) aplicaram o método proposto por TELENTI *et al.* (1993) para diferenciar espécies de micobactérias que não haviam sido estudadas previamente, com ênfase especial na diferenciação de *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. peregrinum*. Estas quatro espécies foram previamente referidas como complexo *M. fortuitum* (composto de *M. fortuitum* var. *fortuitum*, *M. fortuitum* var. *peregrinum*, *M. chelonae* subsp. *chelonae* e *M. chelonae* subsp. *abscessus*). Um algoritmo mais complexo foi proposto por incorporação de novos perfis – três subgrupos de *M. kansasii* (II, IV e V), dois subgrupos de *M. peregrinum* (II e III), um subgrupo de *M. abscessus* (II) e também espécies não analisadas previamente como *M. ulcerans*, “*M. engbackii*”, *M. porcinum*, *M. phlei* e *M. senegalense*. Os membros de complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG) produziram idênticos perfis. *M. avium* e *M. intracellulare* foram diferenciadas, *M. paratuberculosis* apresentou o mesmo perfil de *M. avium*.

RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999) utilizaram a mesma metodologia para caracterizar *M. leprae*. O bacilo foi obtido de diferentes órgãos de tatu e camundongo *nude* infectados experimentalmente. Um total de 15 amostras foi analisado. Todos os isolados produziram padrões de restrição idênticos e o limite de detecção estabelecido foi de 8 a 13 bacilos.

BRUNELLO *et al.* (2001) empregaram a técnica PCR-RFLP do gene *hsp65* proposto por TELENTI *et al.* (1999) para a identificação de micobactérias usando também o gel de poliacrilamida para a separação de fragmentos de restrição. Foram avaliadas 32 espécies já descritas e 22 espécies adicionais e um algoritmo foi derivado para estas 54 espécies.

A análise baseada na eletroforese em gel de poliacrilamida forneceu uma estimativa mais precisa que aquela baseada na eletroforese em gel de agarose do tamanho real dos fragmentos de restrição, como deduzido da análise da sequência, e permitiu identificação de micobactérias cujo perfil de digestão foi claramente identificado por fragmentos mais curtos que 60 pb.

HERNANDEZ *et al.* (1999) desenvolveram uma análise baseada na amplificação por PCR de regiões polimórficas com *primers* fluorescentes seguido por restrição e análise por eletroforese capilar de fluorescência (FCE). Vinte e duas espécies de micobactérias foram identificadas por análise dos fragmentos de restrição de um segmento de 439 pb do gene *hsp65* usando *Hae* III e *Bst* EII e de uma região hipervariável de 475 pb do gene 16S RNAr usando *Hae* III e *Cfo* I.

As amostras foram analisadas em um instrumento de eletroforese capilar de fluorescência e o tamanho dos fragmentos gerados foi comparado com o tamanho de fragmentos determinados por seqüenciamento dos produtos de PCR dos genes usados como alvo. Quatro fragmentos de restrição fluorescentes para cada gene foram gerados (dois fragmentos para cada enzima de restrição, exceto para os casos no quais os produtos de PCR não foram clivados devido a ausência de sítios de restrição).

Entre as 22 cepas, cinco padrões foram observados quando o fragmento do gene *hsp65* foi digerido com *Bst* EII. Nenhum fragmento foi obtido com *Bst* EII para *M. szulgai*. A digestão do fragmento do gene *hsp65* com *Hae* III produziu oito padrões. Um padrão foi comum para o complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. africanum*), mas não com *M. microti*. Embora *M. microti* é incluída no complexo, seu padrão com *Hae* III foi compartilhado com *M. avium* e *M. intracellulare*. O fragmento do gene 16S RNAr digerido com *Cfo* I produziu seis padrões. Nenhum fragmento foi observado para *M. gordonae*. Seis padrões resultantes da digestão do gene 16S RNAr com *Hae* III foi observado entre as 22 espécies. Um único padrão foi observado para o complexo *M. tuberculosis*, exceto para *M. microti*. Portanto, *M. microti* foi diferenciada dos outros membros do complexo *M. tuberculosis*.

Quando o tamanho dos fragmentos obtidos por análise de FCE foi comparado com aqueles determinados por análise da seqüência de DNA, foi encontrado que a diferença variou de um a quatro pares de bases (exceto para um fragmento com *Hae* III para *M. fortuitum* e *M. peregrinum*). Embora seis e nove espécies pudessem ser identificadas após digestão do produto de PCR do fragmento do gene *hsp65* e 16S RNAr, respectivamente, por uma única enzima, a identificação de todas as espécies requer a análise de todos os oito fragmentos.

De 22 espécies, foram obtidos distintos padrões RFLP para 19 espécies. Três membros do complexo *M. tuberculosis* apresentaram um padrão RFLP comum.

GOH *et al.* (2001) fazem referência a inclusão de *M. canetti* como membro do complexo *M. tuberculosis*. Os autores investigaram os organismos do complexo *M. tuberculosis* por PCR-RFLP de um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* e mostraram que *M. canetti* pode ser diferenciada dos demais membros do complexo. O perfil de digestão obtido com a enzima *Hha* I permitiu esta distinção.

HÄFNER *et al.* (2004) utilizaram a técnica PCR-RFLP de um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* com as enzimas *Bst* EII e *Hae* III para relatar padrões de cinco espécies raramente isoladas e quatro subespécies ou variantes, para as quais padrões não haviam sido publicados.

WONG *et al.* (2001) desenvolveram uma análise baseada em PCR-RFLP de um fragmento de 294 pb do gene *hsp65* usando as enzimas *Sau* 96I e *Cfo* I. Um algoritmo foi produzido para 43 espécies e subespécies.

Os padrões de restrição para o complexo *M. tuberculosis* e para o complexo *M. avium* foram distintos. Ocorreu diferenciação entre *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*. Para o complexo *M. terrae* o perfil RFLP foi muito heterogêneo.

A análise foi proposta para que os mais freqüentes isolados, em particular *M. tuberculosis* e *M. avium*, pudessem ser identificados com facilidade.

AVANISS-AGAJANI *et al.* (1996) desenvolveram um método de PCR-RFLP usando uma região de 480 pb do gene 16S DNAr para a identificação de 13 espécies de micobactérias. A seqüência-alvo compreende uma região 5' e central do gene 16S RNAr. O primer 5' foi marcado com fluorescência na sua extremidade 5', portanto, as moléculas de DNA amplificadas têm uma marcação fluorescente na extremidade 5'. O produto de PCR foi digerido com enzimas de restrição (*Dpn* II, *Hae* III, *Hha* I, *Msp* I e *Rsa* I) e um seqüenciador de DNA automatizado foi empregado para determinar o tamanho dos fragmentos de restrição marcados. Desde que o produto de PCR é marcado apenas na extremidade 5', a análise identifica apenas o fragmento próximo da extremidade 5'. Cada espécie tem um único fragmento de restrição 5' para cada endonuclease. Um conjunto de enzimas de restrição produz um conjunto único de fragmentos para cada espécie, permitindo assim a identificação.

O tamanho do fragmento observado foi comparado com o tamanho calculado e observou-se que mais da metade dos tamanhos dos fragmentos observados e calculados eram idênticos ou diferiam no máximo por três pares de bases. Para um par de espécies (*M. avium* e *M. intracellulare*) o padrão de fragmentos de restrição marcado foi muito semelhante e a identificação dessas espécies pode não ser possível. O método permite a identificação de mais de um organismo na mesma amostra.

DOBNER *et al.* (1996) propuseram o método PCR-RFLP usando como alvo uma região de 0,3 a 0,4 Kb (kilobases) não codificante, hipervariável e anterior a região codificante para 16S RNAr. A região promotora é mais polimórfica que a região 16S DNAr inteira ou ao fragmento de 0,36 Kb do gene *hsp65*. Oito espécies de micobactérias foram estudadas, incluindo *M. leprae*, a qual foi obtida de tecido de camundongo infectado.

O padrão de RFLP de *M. bovis* foi idêntico a aquele de *M. tuberculosis*. Padrões RFLP distintos foram observados para *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. smegmatis*.

KASAI, EZAKI e HARAYAMA (2000) determinaram a seqüência do gene *gyrB* de 15 espécies de micobactérias e observaram que mais substituições foram encontradas na seqüência do gene *gyrB* do que nas seqüências 16S DNAr e ITS. A análise da seqüência *gyrB* permitiu a determinação de *primers* para a amplificação específica de espécies do complexo *M. tuberculosis*. A digestão dos produtos de PCR com *Rsa* I e *Taq* I possibilitou a diferenciação de quatro espécies do complexo (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*).

Conforme CHIMARA, FERRAZOLI e LEÃO (2004) o complexo *M. tuberculosis* é formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (subtipos I e II), *M. microti*, "*M. canetti*" e *M. pinnipedii*.

Cepas de referência incluindo *M. tuberculosis*, *M. bovis* subp. *bovis*, *M. bovis* BCG, "*M. canetti*", *M. africanum* e *M. pinnipedii* foram analisadas por PCR-RFLP conforme descrito por KASAI, EZAKI e HARAYAMA (2000), em que um fragmento de 1020 pb do gene *gyrB* foi amplificado e digerido com as enzimas *Rsa* I, *Taq* I e *Sac* II. Baseado nos resultados obtidos e em informações de seqüência *gyrB*

publicadas, um algoritmo foi elaborado. *M. tuberculosis*, *M. africanum* II e “*M. canetti*” não foram diferenciadas. O mesmo ocorreu entre as espécies *M. africanum* I e *M. pinnipedii* e entre *M. bovis* subsp. *bovis* e *M. bovis* BCG. *M. microti* e *M. bovis* subsp. *caprae* produziram padrões de RFLP distintos.

LEE *et al.* (2000) desenvolveram uma técnica de PCR-RFLP usando com alvo uma região do gene *rpoB* para a identificação de micobactérias. Foram utilizadas 44 espécies de micobactérias e três espécies relacionadas para a amplificação de uma região de 360 pb do gene. O DNA amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *Msp* I e *Hae* III e após a determinação do tamanho dos fragmentos gerados, um algoritmo foi construído.

Os resultados mostraram que o gene *rpoB* presente em todas as micobactérias e em algumas outras bactérias como *Nocardia* e *Rhodococcus* foi amplificado. Ocorreu a diferenciação entre *M. kansasii* e *M. gastri* e entre *M. abscessus* e *M. chelonae*. Além disso, para algumas espécies como *M. fortuitum*, *M. celatum*, *M. gordonae* e *M. kansasii* foram observadas subsespécies.

Algumas cepas que não foram diferenciadas com as enzimas *Msp* I e *Hae* III poderiam ser separadas com uma terceira enzima. Por exemplo, os membros do complexo *M. tuberculosis* não foram distinguidos usando *Msp* I e *Hae* III, mas a enzima *Sau* 3AI poderia ser usada para diferenciar *M. africanum* dos demais membros do complexo. A enzima *Hinc* II poderia ser usada para diferenciar *M. gordonae* I de *M. celatum* I e *M. abscessus* e *M. chelonae* poderiam ser separadas por *Bst* EII.

KIM *et al.* (2001) utilizaram a mesma região de 342 pb do gene *rpoB*, usada previamente para a identificação de micobactérias por análise de seqüência, como alvo do método PCR-RFLP. A digestão do produto de PCR com as quatro enzimas de restrição (*Hae* III, *Hind* II, *Mva* I e *Acc* II) gerou perfis de restrição distintos. Um algoritmo com 49 cepas de referência foi construído, incluindo a cepa *M. leprae* Thai 53. Os tamanhos exatos dos fragmentos de restrição no algoritmo foram determinados da seqüência de nucleotídeos.

Micobactérias de crescimento rápido e lento puderam ser diferenciadas pela digestão do DNA amplificado com a enzima *Hae* III. A digestão com *Hind* II distinguiu o complexo *M. tuberculosis* de outras micobactérias. Espécies estreitamente

relacionadas como *M. avium*-*M. paratuberculosis*-*M. intracellulare*, *M. celatum* I- *M. celatum* II e *M. marinum*-*M. ulcerans* foram distinguidas. Seis subespécies (I a VI) de *M. kansasii* puderam ser distinguidas de *M. gastri*. O método não apenas diferenciou os isolados obtidos de culturas, mas também permitiu a detecção e identificação de micobactérias diretamente em amostras clínicas.

KIM *et al.* (2004) desenvolveram um método de PCR *duplex* (DPCR) para a diferenciação do complexo *M. tuberculosis* de micobactérias não tuberculosas. O alvo utilizado foi o gene *rpoB* e dois conjuntos de *primers* amplificaram um fragmento de 235 pb e 136 pb do complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas, respectivamente. Quando o método foi aplicado a não micobactérias, cepas de *Tuskamurella*, *Rhodococcus* e *Nocardia* produziram um fragmento de 136 pb. O produto de PCR de micobactérias não tuberculosas pode ser analisado por RFLP ou seqüenciamento para a diferenciação de espécies. Um algoritmo de DPCR-RFLP com *Msp* I e *Hae* III foi proposto.

O gene *dnaJ* codifica uma proteína de estresse é altamente conservado entre o gênero bacteriano. TAKEWAKI *et al.* (1994) demonstraram que a combinação de PCR para o gene *dnaJ* como RFLP pode diferenciar micobactérias.

O par de primer 1 amplificou um fragmento de 236 pb do gene *dnaJ* de 18 espécies de micobactérias. *M. chelonae* produziu um fragmento de 225 pb do gene *danJ* usando o par de primer 2. As 19 espécies puderam ser diferenciadas em dez grupos com as enzimas *Sma* I, *Nae* I, *Hinf* I e *Fok* I. O complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti*) foram diferenciadas das micobactérias não tuberculosas; *M. avium* foi distinguida de *M. intracellulare*; *M. kansasii*, *M. gastri* e *M. marinum* não foram diferenciadas. *M. avium* e *M. paratuberculosis*, que são conhecidas como espécies próximas geneticamente, não foram discriminadas. *M. xenopi*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* não apresentaram sítios de restrição para as quatro enzimas usadas. Mas a diferenciação poderia ser possível quando enzimas diferentes foram usadas, por exemplo, *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. gastri* podem ser separadas com *Hae* I; *M. xenopi* com *Dra* III; *M. fortuitum* com *Hae* II e *M. chelonae* com *Sac* I.

ROTH *et al.* (2000) estabeleceram um método de PCR-RFLP usando como alvo a região intergênica 16S-23S DNAr para a identificação de micobactérias.

Foram investigadas 48 espécies de micobactérias e espécies de outros gêneros. Entre as espécies não micobacterianas, apenas *Gordonia terrae* foi amplificada. O tamanho dos produtos de PCR variou de 200 pb a 330 pb. A maior parte das espécies puderam ser identificadas com as enzimas *Hae III* e *Cfo I* e as demais espécies foram separadas usando enzimas adicionais como *Taq I*, *Msp I*, *Dde I*, *Hinf I* e *Ava II*. O método não distinguiu as espécies *M. marinum* e *M. ulcerans*. Variabilidade intraespécie foi observada em *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. parafortuitum*, *M. kansasii*, complexo *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. phlei* e *M. scrofulaceum*. Baseado no perfil de restrição, um algoritmo foi proposto.

3.1.9.8 Microarranjo de DNA

O microarranjo de DNA oferece a possibilidade de exame rápido de grande quantidade de DNA com uma única etapa de hibridização. Este método é aplicado para a identificação de espécies e detecção de mutações que conferem resistência a rifampicina em micobactérias (SOINI; MUSSER, 2001).

O microarranjo de DNA ou DNA *chip* geralmente consiste de uma superfície de vidro na quais múltiplas sondas de DNA com identidades conhecidas são fixadas para a hibridização molecular com amostras de DNA, a qual permite o exame da expressão genética ou genotipagem. Este método permite a análise simultânea de milhares de genes em um curto tempo de análise e é útil para a análise filogenética. Para a identificação de bactérias, este método pode envolver a marcação de RNA transcrito *in vitro* de um gene alvo da bactéria, subsequente hibridização do RNA transcrito *in vitro* marcado com sondas espécie-específicas em um *microarray* e detecção da marcação geralmente por fluorescência (FUKUSHIMA *et al.*, 2003).

GINGERAS *et al.* (1998) utilizaram o microarranjo de DNA com sondas complementares a sequência do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* de 705 pb. O método permitiu a detecção de mutações que conferem resistência a rifampicina em isolados de *M. tuberculosis* e a identificação de dez espécies de micobactérias.

TROESCH *et al.* (1999) realizaram o microarranjo baseado no gene 16S RNAr para a identificação de 27 espécies de micobactérias e no gene *rpoB* para a

detecção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. No estudo, *M. avium* e *M. paratuberculosis*, *M. kansasii* e *M. gastri*, *M. marinum* e *M. ulcerans*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* e *M. chelonae* e *M. abscessus* não foram individualmente identificadas. Todas as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina foram corretamente detectadas.

FUKUSHIMA *et al.* (2003) desenvolveram um microarranjo baseado na sequência do gene *gyrB* para a identificação de 14 espécies de micobactérias. A maioria das espécies não podia ser identificada com uma única sonda, então, um conjunto de 28 sondas foi usado para a identificação. O estudo mostrou que a tecnologia pode identificar espécies e pode distinguir aquelas estreitamente relacionadas, como *M. bovis* e *M. tuberculosis*; *M. avium* e *M. intracellulare*. O método foi também capaz de identificar dois tipos de bactérias em casos de infecção dupla e detectar diretamente micobactérias de amostras clínicas.

3.1.9.9 PCR-hibridização

BÖDDINGHAUS *et al.* (1990) descreveram seqüências de nucleotídeos específicas ao gênero, grupo ou espécie de micobactérias por comparação de seqüências de 16S RNAr. No estudo, os autores desenvolveram sondas de DNA espécie-específicas para o grupo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*), grupo *M. avium* (*M. avium*, *M. paratuberculosis*) e *M. intracellulare*. Seqüências de nucleotídeos também foram investigadas para detectar micobactérias por hibridização e PCR.

A sensibilidade de procedimento de amplificação foi avaliada com *M. tuberculosis*, como um sistema modelo. Através do uso da diluição em série de ácido nucléico purificado, 10 pg de ácido nucléico adicionado à mistura de reação poderia ser amplificado suficientemente para produzir um fragmento detectável em gel de agarose. Quando a presença de DNA micobacteriano amplificado foi identificada por hibridização com oligonucleotídeos marcado com ^{32}P pela análise *slot blot*, a sensibilidade foi melhorada para aproximadamente 100 vezes. Quando a transcrição reversa de extrato de ácido nucléico em cDNA (DNA complementar) foi realizada antes da PCR, a sensibilidade foi aumentada 1000 vezes.

Como um outro teste para determinar a sensibilidade do procedimento de amplificação, soluções de ácido nucléico de diluições em série de uma suspensão contendo um número conhecido de células de *M. tuberculosis* foram adicionadas à mistura de reação. Quando alíquotas da mistura de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, um fragmento discreto de aproximadamente 1.0 kilobase (Kb) foi visível em amostras contendo 500 micobactérias. Porém, quando o RNAr foi transcrito em cDNA antes da PCR, resultou em um fragmento definido de tamanho adequado em amostras contendo aproximadamente 30 micobactérias. A combinação dos procedimentos de amplificação e hibridização resultou em um limite de detecção de três micobactérias na amostra.

TAKEWAKI *et al.* (1993) demonstraram que a amplificação por PCR do gene *dnaJ* usando *primers* específicos para micobactérias e subsequente análise *dot blot* com sondas espécie-específicas permitiu a amplificação do complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. kansasii*.

ZOLG e PHILIPPI-SCHULZ (1994) empregaram o gene que codifica a enzima superóxido dismutase (SOD) como alvo na identificação de micobactérias. Foram desenvolvidos *primers* específicos ao gênero que permitiram a amplificação de todas as 28 espécies de micobactérias testadas. Um *pool* de sondas gênero específicas reconheceu 23 das 28 espécies. Também, foram identificadas sondas espécie-específicas para *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi*.

BEENHOUWER *et al.* (1997) desenvolveram um método que combina PCR e OSCP (oligonucleotide-specific capture plate hybridization) para a detecção e identificação de micobactérias. O alvo utilizado foi um segmento do gene 16S DNAr. Durante a PCR, um marcador (dUTP-11-digoxigenina) foi incorporado no produto de PCR. Após a amplificação, o *amplicon* é hibridizado em placas de microtitulação revestidas com estreptavidina preparadas com oligonucleotídeo espécie-específico biotinilado. Um oligonucleotídeo específico ao gênero e sete oligonucleotídeos espécie-específicos (complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. genavense* e *M. chelonae-M. abscessus*) foram designados como sondas de captura. Após a hibridização específica, o emprego da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) revelou especificamente o

complexo ligado, permitindo a identificação da espécie. O teste de sensibilidade revelou que o método pode detectar aproximadamente três micobactérias, enquanto a PCR, aproximadamente 300 micobactérias.

LEE *et al.* (2003) analisaram a seqüência de uma região de 360 pb do gene *rpoB* de 26 espécies de micobactérias. A análise da seqüência desta região mostrou que as espécies estudadas poderiam ser distinguidas. Por exemplo, houve diferenciação entre *M. kansasii* e *M. gastri*, entre *M. abscessus* e *M. chelonae* e entre *M. fortuitum* e *M. peregrinum*. Subespécies de *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. gordonae* também foram diferenciadas. Porém, não foram observadas diferenças na seqüência entre as espécies do complexo *M. tuberculosis*, incluindo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*. Baseado na análise da seqüência, os autores desenvolveram sondas que mostraram serem úteis para a identificação de micobactérias por técnica de hibridização por *dot blot*.

3.1.10 Significado Clínico

A maioria das espécies de micobactérias é distribuída da natureza, mas, outras como o complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae* são encontradas em tecidos humanos ou de animais.

É uma observação comum que micobactérias não tuberculosas causam doenças em indivíduos com o sistema imune alterado. Doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, bronquiectasia, fibrose cística, gastrectomia, alcoolismo crônico, procedimentos cirúrgicos e AIDS (síndrome de imunodeficiência adquirida) são algumas das condições predisponentes de doença devido a estas micobactérias. O mecanismo de patogênese dessas micobactérias não é claro (KATOCH, 2004).

A seguinte seção contém a descrição de doenças associadas com algumas espécies clinicamente importantes de micobactérias. Segundo KATOCH (2004) quando 95 espécies eram caracterizadas, aproximadamente 30 espécies eram associadas a doenças em humanos. A espécie, *M. leprae*, será discutida no item 3.2.

- Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Os membros do complexo *M. tuberculosis* são os agentes causadores da tuberculose em humanos e em animais. Apesar da estreita relação genética, as espécies do complexo diferem na epidemiologia, patogenicidade, âmbito geográfico e preferência de hospedeiro (CHIMARA; FERRAZOLI; LEÃO, 2004).

O complexo *M. tuberculosis* não ocorre na natureza e depende da transmissão do hospedeiro para a sua sobrevivência. O *M. tuberculosis* é a principal causa de doença humana (TOOSSI; ELLNER, 1999). *M. bovis* causa tuberculose em bovinos, humanos e outros primatas, carnívoros, incluindo cães e gatos, suínos, papagaios, e algumas aves de rapina. A doença produzida em humanos é virtualmente indistinguível daquela causada por *M. tuberculosis* e é tratada semelhantemente (NOLTE; METCHOCK, 1995). A linhagem de *M. bovis*, conhecida como BCG (bacilo Calmette-Guérin) é usada como vacina contra a tuberculose (KONEMAN *et al.* 2001). *M. africanum* causa tuberculose em humanos na África tropical. *M. microti* causa tuberculose em rato silvestre e produz lesões locais em cobaias, coelhos e bezerras (NOLTE; METCHOCK, 1995). Segundo KASAI, EZAKI e HARAYMA (2000), *M. microti* também acomete humanos.

Certos subgrupos da população possuem risco elevado de adquirir tuberculose, seja por maior probabilidade de exposição e infecção ou por serem mais propensos a progredir para doença ativa. Em alguns casos, ambos os fatores podem ser importantes. A infecção com HIV (vírus da imunodeficiência humana) é o maior fator de risco conhecido para a ativação da infecção tuberculosa latente em doença clínica (NOLTE; METCHOCK, 1995). Numerosos estudos mostraram a contribuição de fatores genéticos no controle da suscetibilidade a tuberculose. Por exemplo, evidência positiva para o envolvimento no controle da suscetibilidade do hospedeiro à tuberculose já foi obtida para genes HLA, *NRAMP1*, *VDR*, *IL-1Ra* e *IL-1b* (MARQUET; SCHURR, 2001).

O *M. tuberculosis* é carregado em partículas transportadas pelo ar que são geradas quando o paciente com tuberculose pulmonar tosse, espirra ou fala. Estas partículas têm de 1 a 5 µm de tamanho e são mantidas suspensas no ar por correntes de ar. A infecção ocorre quando uma pessoa suscetível inala as partículas

contendo o *M. tuberculosis*. As partículas infectadas alcançam as vias respiratórias terminais no pulmão e no alvéolo, onde os microrganismos são engolfados pelos macrófagos alveolares. Normalmente, a resposta imune mediada por células do hospedeiro limita a multiplicação e a propagação do *M. tuberculosis*; porém, algum bacilo pode permanecer viável, mas dormente por muitos anos após a infecção inicial.

A tuberculose pulmonar em adultos é um processo inflamatório lentamente progressivo caracterizado por inflamação crônica intensa, necrose e caseação. As cavidades que se formam nos pulmões podem romper dentro de brônquios, permitindo que grande número de organismos se espalhe para outras áreas do pulmão e sejam aerossolizadas pela tosse, e, portanto, infectando outras pessoas. As características clínicas comuns de tuberculose pulmonar incluem tosse, perda de peso, febre baixa, dispnéia e dor torácica. A tuberculose em pacientes com AIDS progride muito mais rapidamente e, muitas vezes, se dissemina (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Além da tuberculose pulmonar, a tuberculose pode ser extrapulmonar. Os locais mais comuns de tuberculose extrapulmonar são linfonodos, a pleura, o trato gastrointestinal, ossos e articulações, meninges e peritônio, mas praticamente qualquer sistema orgânico pode ser acometido (RAVIGLIONE; O'BRIEN, 1998).

- Complexo *M. avium*

O complexo *M. avium* inclui *M. avium* e *M. intracellulare* (VOSSLER, 2000). *M. avium* possui três subespécies, que são: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum* (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 1998; RIDOM, 2006).

Os organismos do complexo que causam doença em humanos são *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. paratuberculosis*. Embora *M. avium* e *M. intracellulare* sejam organismos distintos, estes organismos são muito semelhantes e a distinção entre eles não pode ser feita por determinações laboratoriais de rotina ou em bases clínicas. Como resultado, algumas vezes esses organismos são referidos como *M. avium-intracellulare*. Além disso, devido o isolamento de *M. paratuberculosis* em

laboratórios de rotina ser raro, o termo complexo *M. avium* é geralmente usado para relatar os isolados de *M. avium-intracellulare* (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

Organismos do complexo *M. avium* estão difundidos na natureza e foram isolados da água, solo, plantas, poeira doméstica e de outras fontes ambientais. *M. avium* causa doença em aves domésticas e suínos. As águas naturais parecem ser o reservatório para infecções em humanos (VOSSLER, 2000). Infecções humanas por *M. avium-intracellulare* podem ser adquiridas por ingestão de águas ou alimentos contaminados ou por inalação de microrganismos em aerossóis aquosos (KONEMAN *et al.*, 2001).

O complexo *M. avium* emergiu como um importante patógeno em imunocomprometidos e imunocompetentes. Aproximadamente 90% das infecções micobacterianas em pacientes com AIDS envolve o complexo *M. avium* ou *M. tuberculosis*, e os outros 10% de infecções são causadas por outras espécies não tuberculosas (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

O complexo causa doença pulmonar, linfadenite e doença disseminada. Pacientes com AIDS podem apresentar infecção focal ou disseminada. A infecção focal geralmente envolve pulmões, trato gastrointestinal e ocasionalmente linfadenite periférica. A infecção disseminada ocorre, normalmente, após um ano ou mais do diagnóstico de AIDS, quando a contagem de CD4 é menor que 100 células por mm³ (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Existem evidências de uma associação entre a doença de Crohn e *M. paratuberculosis*. A doença de Crohn é uma doença inflamatória de intestino que ocorre em humanos. Esta doença é semelhante a doença de Johne, causada por *M. paratuberculosis*, que ocorre em bovinos, ovinos e caprinos (NOLTE; METCHOCK, 1995). O envolvimento de *M. paratuberculosis* na doença de Crohn ainda não foi elucidado (KATOCH, 2004).

- *M. kansasii*

Cepas de *M. kansasii* foram isoladas de água (VOSSLER, 2000). Acredita-se que a água de torneira é o maior reservatório associado com doença em humanos (RIDOM, 2006). A manifestação mais comum é doença pulmonar crônica.

Infecções extrapulmonares incluem linfadenite, infecção de pele e de tecidos moles e infecção em articulações. Doença disseminada raramente ocorre em pacientes imunocompetentes, mas, é relatada em pacientes severamente imunocomprometidos, particularmente aqueles com AIDS (VOSSLER, 2000).

- *M. scrofulaceum*

M. scrofulaceum é freqüentemente associada com linfadenite cervical em crianças. Infecções extranodais incomuns incluem doença pulmonar, doença disseminada, conjuntivite, osteomielite, meningite e hepatite granulomatosa (NOLTE; METCHOCK, 1995). Organismos com características de *M. scrofulaceum* e do complexo *M. avium* são referidos como *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* ou grupo MAIS (VOSSLER, 2000).

- *M. xenopi*

O organismo é recuperado de água potável, incluindo água estocada em tanques em hospitais e em aves. Doença pulmonar é a manifestação mais comum da infecção, normalmente ocorre em pacientes com doença pulmonar subjacente ou com outras condições predisponentes (malignidade de pulmões, alcoolismo ou diabetes). Infecções disseminadas e extrapulmonar são descritas em indivíduos imunocomprometidos, incluindo receptores de transplante renal, pacientes de diálise peritoneal e pacientes com AIDS (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- Grupo *M. fortuitum*

O grupo *M. fortuitum* é formado por *M. fortuitum* (antigamente *M. fortuitum* biovar. *fortuitum*), *M. peregrinum* (antigamente *M. fortuitum* biovar. *peregrinum*) e complexo *M. fortuitum* terceiro biovariante (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2002).

Comum no ambiente, *M. fortuitum* é isolado da água, solo e poeira (NOLTE; METCHOCK, 1995). O grupo é implicado em infecções de ferida pós-traumática

localizada, infecções de cateter e infecções de ferida cirúrgica (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2002). Os organismos do complexo também causam osteomielite, celulite, otite média, úlcera corneal e doença pulmonar crônica (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- *M. chelonae*

Este organismo causa infecções de ferida pós-traumática localizada, infecções corneal pós-cirúrgica ou pós-traumática e infecções de cateter. Em pacientes que recebem corticosteróides e recptores de órgãos causa infecção de pele disseminada e infecção de cateter (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2002). O organismo foi isolado do solo (RIDOM, 2006).

- *M. szulgai*

Das infecções relatadas com *M. szulgai*, a manifestação mais comum é doença pulmonar (VOSSLER, 2000). As infecções extrapulmonares incluem linfadenite, bursite, adenite cervical, tenossinovite, infecção cutânea e osteomielite (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- *M. malmoense*

O organismo é associado à doença pulmonar crônica e adenite cervical (VOSSLER, 2000). Raramente causa doença extrapulmonar e doença disseminada. Seu reservatório ambiental é o solo e a água (RIDOM, 2006).

- *M. simiae*

O organismo foi isolado de água de torneira. São infreqüentes os casos de infecção humana por *M. simiae* e mais freqüentemente causa doença pulmonar em pacientes com preexistente dano em pulmões (VOSSLER, 2000). É relatado, também, que *M. simiae* causa osteomielite e doença disseminada (RIDOM, 2006).

- *M. marinum*

M. marinum é implicado em doenças de peixe e é isolado de aquários. A infecção cutânea em humanos ocorre quando pele traumatizada entra em contato com água doce inadequadamente clorada ou água salgada. Tipicamente, as lesões aparecem como nódulos moles, subcutâneos, vermelhos ou vermelhos-azulados, em geral envolvendo cotovelos, joelho e dedos da mão ou de pés (“granuloma de piscina”). Em alguns casos, um abscesso se desenvolve no sítio primário de inoculação, com disseminação ao longo dos linfáticos (VOSSLER, 2000). Infecções profundas incluindo tenossinovite, artrite, bursite e osteomielite são também relatadas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- *M. ulcerans*

M. ulcerans causa uma infecção ulcerosa que geralmente envolve membros inferiores. Na África, a doença é conhecida como úlcera de Buruli e na Austrália, é chamada de úlcera de Bairnsdale. Tipicamente, a doença aparece como um nódulo subcutâneo indolor no local do traumatismo prévio. Após poucas semanas, uma úlcera pouco profunda se desenvolve no lugar do nódulo. As lesões podem tornar-se necróticas e se estenderem para o tecido subcutâneo. Também podem aparecer nódulos satélites que podem ulcerar (NOLTE; METCHOCK, 1995).

- *M. haemophilum*

As raras infecções associadas com *M. haemophilum* ocorrem principalmente em paciente imunocomprometidos. Foram relatados casos em pacientes com doença de Hodgkin e AIDS. Linfadenite submandibular, nódulos subcutâneos, edema dolorosos e úlceras que podem progredir para abscessos e fístulas são freqüentemente as manifestações clínicas (VOSSLER, 2000).

- *M. abscessus*

Este organismo causa doença pulmonar crônica, infecções de ferida pós-traumática localizada, infecção de ferida cirúrgica, infecção de cateter e otite média crônica. Em pacientes imunossuprimidos causa infecção de pele disseminada e infecções de cateter (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2002). É encontrado em água de torneira e freqüentemente isolado de pacientes com fibrose cística (RIDOM, 2006).

3.2 HANSENÍASE

3.2.1 História

Conforme OPRMOLLA (2000), muito já se escreveu sobre a origem e existência da hanseníase em várias regiões da antigüidade. Observa-se, contudo, que muitos desses escritos são citações de fontes descrevendo a moléstia sem seus aspectos mais característicos que são as deformidades provocadas e sinais de comprometimento neurológico ou dermatoneurológico como manchas ou áreas cutâneas com distúrbios de sensibilidade, e vários deles são traduções errôneas de termos designando diferentes moléstias.

Apesar disso, há referências com relação à hanseníase em livros muito antigos. Ao que parece, essa doença já era conhecida na Índia em 1500 a.C. (antes de Cristo), e no Regveda Samhita (um dos primeiros Vedas que eram os livros sagrados da Índia), a hanseníase é denominada *Kushta* apresentando dois tipos de manifestações, um que era a anestesia local e deformações nas extremidades e outro caracterizado por ulcerações, queda de dedos e desabamento da pirâmide nasal. Em 600 a.C., em uma recompilação denominada Sushruta Samhita, esses dois tipos são referidos como *vatratka* e *vat-somhita*, respectivamente.

Há a possibilidade da hanseníase ter se originado na Índia e de lá ter seguido para o leste, gerando focos no Sudeste asiático, China e Japão. Há, contudo, na China, referências muito antigas sobre essa doença, como aquela feita em um dos tratados médicos chineses mais antigos, o Nei Ching Su Wen, atribuído

ao imperador Huang Ti. Esse tratado é uma recompilação de antigos textos realizada em 600 a.C., e nele é usado o termo “*li-feng*” para designar paralisia grave, e descrito um estado mórbido “*ta-feng*” que provoca queda de sobrancelhas, nódulos, ulceração, dormência, mudança de cor de pele e desabamento do nariz.

Diz-se também que a hanseníase existiu em épocas remotas no Egito, e que, no “Papiro de Ebers” (18ª Dinastia 1300-1800 a.C.) era citada. Contudo o que foi traduzido como lepra no referido documento em uma “queixa de caráter externo para o qual era prescrito um ungüento”. Muitas outras afirmativas da existência da hanseníase no Egito, naquele tempo, têm como fonte o Papiro de Ebers.

Na Bíblia, o termo “*tsraath*” (ou *saraath*), no hebraico, significava uma condição anormal da pele dos indivíduos, das roupas, ou das casas, que necessitava purificação. Aqueles que apresentassem o “*tsraath*” deveriam ser isolados até que os sinais desta condição desaparecessem.

Segundo o Livro Sagrado, o “*tsraath*” na pele dos judeus seriam “manchas brancas deprimidas em que os pêlos também se tornavam brancos”. Na tradução grega do texto hebraico, a palavra “*tsraath*” foi traduzida como lepra e “lepros”, em grego, significa “algo que descama”. A palavra lepra também foi usada pelos gregos para designar doenças escamosas do tipo da psoríases, e a hanseníase era chamada de elefantíase.

Autores admitem a possibilidade da hanseníase ter chegado à Ásia Menor e Grécia através do Império Persa pelo seu contato com o foco da Índia. Heródoto refere a presença da enfermidade na Pérsia em 500 a.C.

A hanseníase não era conhecida na Europa na época de Hipócrates (467 a.C.). Nos trabalhos do “Pai da Medicina”, não há referência a qualquer condição que se assemelhasse àquela doença.

Admite-se que foram as tropas de Alexandre, o Grande, quando voltavam à Europa, que trouxeram soldados contaminados com a doença nas campanhas realizadas na Índia (300 a.C.). Depois as conquistas romanas se encarregaram de disseminar a doença para outras regiões européias.

A hanseníase era bem conhecida por volta do ano 150 d.C. (depois de Cristo), quando se encontram referências sobre ela, feitas por Areteo da Capadócia e por Galeno. O primeiro autor, no seu trabalho “Terapeuta de Afecções Crônicas”,

designa a hanseníase como Elephas ou Elefantíase. Foi ele quem denominou, pela primeira vez, de “face leonina”, a face infiltrada do paciente com hanseníase virchoviana.

Na obra chinesa intitulada “Remédios Secretos Completos” o autor Hua To, nascido em 190 d.C., descreve uma doença que provoca perda de sensibilidade, na qual aparecem manchas vermelhas que incham e depois se ulceram ocorrendo em seguida queda de sobrancelhas, cegueira, deformidades dos lábios, rouquidão, ulceração nas plantas dos pés, achatamento do nariz e deslocamento de articulações. Também na China, Ko Hung escreve que os primeiros sintomas do “*lai ping*” são dormência da pele e sensação de vermes andando.

A hanseníase continuou sua disseminação pela Europa depois da queda do Império Romano e o início da Idade Média. Atingiu o seu máximo, naquele continente, entre os anos 1000 e 1300 que coincide com o período das Cruzadas. Foram oito as Cruzadas e a última foi conduzida por São Luís, rei da França, em 1270, que culminou com a expulsão dos cristãos do Oriente Médio e do norte da África, e que deu origem ao retorno para o continente europeu de muitos soldados, aventureiros, comerciantes e entre eles doentes de hanseníase.

A hanseníase era designada como lepra, como também assim eram denominadas todas as doenças que se supunham ser idênticas ou ter alguma relação com ela. Outras condições como a miséria tinham a mesma conotação. O termo lepra absorveu, então, outras designações da doença como a elefantíase, assim como incorporou a designação de outras doenças.

A elefantíase dos gregos, por exemplo, se tratava hoje de hanseníase e os árabes empregavam a denominação “*dal fil*” (doença do elefante) para a doença que hoje se conhece como elefantíase (filariose). Então, duas entidades nosológicas diferentes ficaram com o mesmo nome: elefantíase dos árabes e elefantíase dos gregos.

Os árabes, por outro lado, conheciam a elefantíase dos gregos e a denominavam com os nomes de “*judam*”, “*juzam*”, “*alzuzam*”, e “*dsjuddam*”. Esses termos foram traduzidos pelos autores europeus como lepra, que era empregado pelos médicos gregos, para designar muitas afecções escamosas que não tinham relação com a elefantíase dos gregos ou com elefantíase dos árabes. Foi assim que

os termos elefantíase grega e lepra árabe se tornavam sinônimos. Também se tornaram sinônimos de lepra, a “*leuke*” (vitiligo), a morféia e a pelagra.

Os médicos antigos não tinham uma idéia exata das doenças cutâneas. Alguns colocavam na mesma categoria o líquem, a psora (psoríase) e a lepra, ou a gale (sarna), o impetigo e a lepra, de maneira que eles viam cada uma dessas afecções como graus sucessivamente mais altos de uma mesma entidade mórbida. Chegavam a considerar a elefantíase como grau mais alto de lepra.

Além disso, o diagnóstico da doença era feito de maneira imprópria. A lei de Strasbourg, por exemplo, exigia que quatro pessoas fossem designadas para examinar e diagnosticar um portador de lepra. No fim do século XV, exigia-se que entre as quatro pessoas houvesse um médico, um cirurgião e dois barbeiros. Eles tinham que realizar os testes de urina e do sangue nos pacientes.

Durante os anos 1100 e mesmo depois houve um grande surto de simpatia e piedade pelos “leprosos”, encorajado pela Igreja. Esta ensinava que essas pessoas infelizes eram os pobres de Cristo. Datam desse período San Martin e Isabel da Hungria (1207-1231). Ela era casada com o Landgrave Luis de Turingia e fundou numerosos edifícios para isolamento desses pacientes que eram administrados por ordens religiosas e, foi canonizada em 1235 como santa padroeira dos doentes de lepra.

Como resultado dessa devoção, os lazaretos foram fundados em todos os lugares, destinados aos doentes de lepra, entre os quais existiam tanto doentes de hanseníase, como aqueles portadores de outras doenças cutâneas e mesmos indivíduos sãos, como mendigos.

O número de doentes na Europa diminui a partir do século XVI. Uma das causas poderia ter sido a melhoria das condições de vida, e outra é que o “complexo” lepra foi se esvaziando porque as doenças cutâneas foram sendo melhor estudadas e foram recebendo os seus nomes definitivos.

Nas Américas, a hanseníase deve ter chegado com os colonizadores entre os séculos XVI e XVII. Nos Estados Unidos, foram os franceses, que deram origem ao estado de Louisiana, os que provavelmente trouxeram a hanseníase; na América do Sul, a doença teria sido trazida pelos colonos espanhóis e portugueses.

No Brasil, os primeiros documentos que atestavam a existência da hanseníase datam do fim do século XVII, tanto que, em 1696, o governador Artur de Sá e Menezes procurava dar assistência no Rio de Janeiro, aos “míseros leprosos”, já então em número apreciável.

De acordo com ANDRADE (1996), no ano de 1741, dois médicos na cômte redigiram a primeiro regulamento para combater a lepra no Brasil. A hanseníase foi considerada uma doença contagiosa e, como medida de controle, se estabeleceu o isolamento dos doentes. Esse isolamento deveria ser efetuado em asilos especiais segundo o sexo e as condições sociais. A partir da instituição desse regulamento, inicia-se a construção de asilos para lázaros. No período Colonial fundaram-se hospitais no Rio de Janeiro (1741), em São Paulo (1799) e na Bahia (1784). O primeiro hospital asilo foi edificado no Maranhão em 1833, na cidade de São Luís, durante o império. As principais recomendações do primeiro Congresso Internacional de Lepra, realizado em 1897 na cidade de Berlim, foram o isolamento compulsório, a notificação obrigatória dos casos e a vigilância dos contatos. Em 1912, propõe-se que o isolamento fosse feito em asilos-colônias.

Segundo OPRMOLLA (2000), em 1952, a Organização Mundial de Saúde (OMS) havia enviado ao Brasil uma Comissão que recomendou, em benefício da doença, que colocasse fim aos isolamento compulsório como outros países haviam feito. Nesse ano, foi realizada a IIIª Reunião dos Leprólogos Brasileiros na cidade de Três Corações, em Minas Gerais, onde se reconheceu a importância da sulfona como uma arma profilática tendo como consequência o fato do doente tratado com esse medicamento deixar de ser transmissor da doença, podendo, portanto, conviver normalmente em sociedade. Em 1956, por ocasião da IV Reunião dos Leprólogos Brasileiros, foi recomendado o fim do isolamento compulsório, e que o isolamento do doente se restringisse a casos de caráter médico-social ou se houvesse conveniência profilática. Nesse mesmo ano, houve em Belo Horizonte um Seminário de Leprologia promovido pela Organização Pan-Americana da Saúde e pelo Ministério da Saúde cujas conclusões foram que o isolacionismo se apresentava como “inútil para a profilaxia, injusto para o doente, desintegrador de lares, estigmatizante, auxiliar de preconceitos, mantenedor de superstições, e, tudo isso, “as custas de elevadas despesas que poderiam ser aplicadas em técnicas mais

racionais e eficazes”. No ano seguinte, na Vª Reunião dos Leprólogos Brasileiros, na cidade de Cambuquira em Minas Gerais, Orestes Diniz provou que o ônus financeiro do modelo isolacionista o tornava inexecutável para o país e que, do ponto de vista epidemiológico, havia se demonstrado ineficiente, visto a impossibilidade real de internamento de todos os doentes contagiosos e a impossibilidade de controle de todos os comunicantes (pessoas que convivem com os doentes).

Em 1955, o Serviço Nacional de Lepra implantou no Rio de Janeiro um projeto piloto visando observar os resultados do tratamento domiciliar de todos os doentes, a vigilância dos comunicantes, e não mais o isolamento compulsório. Com os resultados obtidos desse projeto, as recomendações do Congresso de Madri em 1953, e o apoio do Governo que estava se instalando, teve início a chamada “Moderna Campanha Nacional contra a Lepra” com a finalidade de estender para todo o país um programa baseado no projeto do Rio de Janeiro.

A lei federal número 610 que instituiu o isolamento, contudo, continuava vigente e o Serviço Nacional de Lepra procurou meios para tentar revoga-la. Em 1962, o então Primeiro Ministro Tancredo Neves instituiu o Decreto Federal nº 968 de 07/05/1962, que apesar de não revogar a lei 610, liberava o doente e acabava com o isolamento.

No VIIº Congresso Internacional de Leprologia realizado no Rio de Janeiro em 1963, foram apresentados muitos trabalhos atestando os resultados ineficazes da política isolacionista e os bons resultados do tratamento ambulatorial dos pacientes.

Em 1970, o Professor Abrão Rotberg conseguiu modificar oficialmente, no Brasil, a designação da doença substituindo o termo “lepra” por “hanseníase”, com o intuito de auxiliar no processo de sua desestigmatização (OPROMOLLA, 2000). Em 1975, o Ministério da Saúde adotou o termo “hanseníase” pelo Decreto nº 76.078, de 04/08/1975 do Governo Geisel. Em 29 de março de 1995, por intermédio de Lei Federal nº 9.010, tornou-se obrigatório o uso da terminologia hanseníase em substituição ao “termo” lepra (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005).

Hoje, com o auxílio de medidas terapêuticas eficazes, no Brasil está realizando um trabalho coordenado e intenso para controlar a hanseníase em seu território, fazendo com que o Brasil irmanado a outras nações e sob amparo da

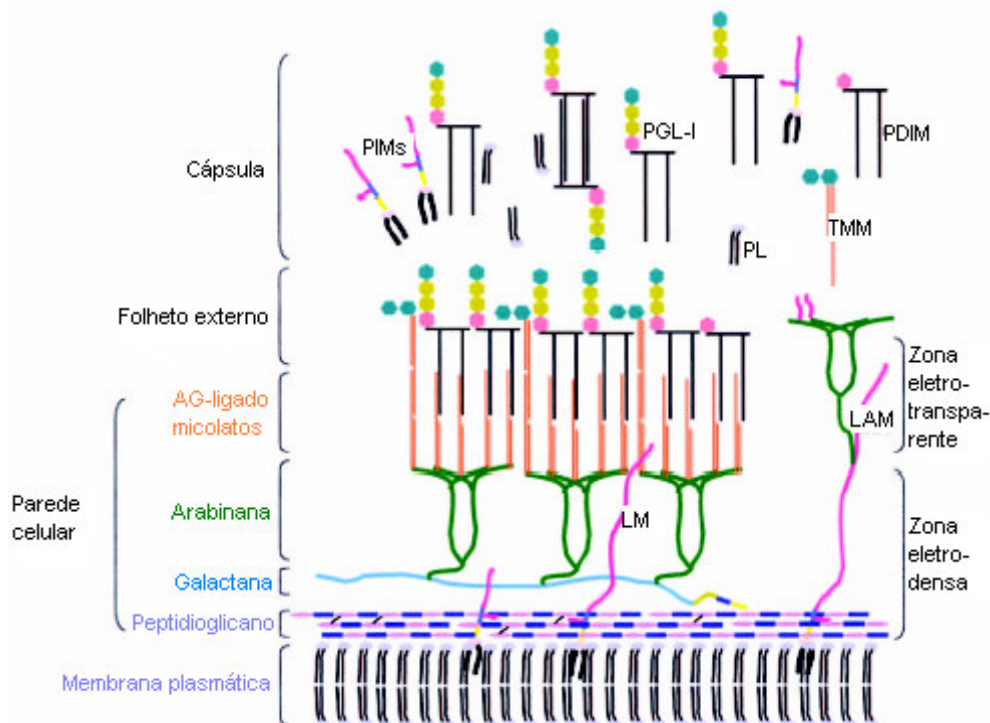
Organização Mundial da Saúde consiga atingir a meta de eliminar a doença como um problema de saúde pública, ou seja, um doente por 10.000 habitantes (OPROMOLLA, 2000).

3.2.2 Etiologia

O agente etiológico da hanseníase – o *Mycobacterium leprae* – foi descoberto pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, em 1873 (HANSEN, 1955).

Morfologia celular: o *M. leprae* é um bastonete imóvel, não formador de esporos, microaerófilo, ácido-resistente, reto ou levemente curvado (SCOLLARD *et al*, 2006). Estudos concluíram que sua parede celular é um complexo covalentemente ligado de peptidoglicano-arabinogalactana-ácido micólico semelhante na composição a parede celular de todas as micobactérias (figura 3).

A parede celular contém peptidoglicano, composto de cadeias alternantes de N-acetilglucosamina e N-glicolilmuramato ligadas por pontes peptídicas, o qual é ligado a camada galactana pela arabinogalactana. Três cadeias ramificadas de arabinose estão por sua vez ligadas a galactana, formando, junto com a camada de peptidoglicano, uma zona eletro-densa. Os ácidos micólicos estão ligados aos terminais das cadeias de arabinose para formar o folheto interno da bicamada pseudolipídica. O folheto externo é composto de ácidos micólicos intercalantes de monomicolatos de trealose e ácidos micoserósicos de dimicocerosatos de ftiocerol assim como glicolipídios fenólicos (PGLs), formando a zona eletro-transparente (VISSA; BRENNAN, 2001). Supõe-se que muitas dessas moléculas junto com manosídeos de fosfatidilinositol e fosfolipídios são liberados da parede celular após a síntese, formando uma cápsula. O lipídio dominante na parede celular, que confere ao *M. leprae* especificidade imunológica é o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1) (SCOLLARD *et al*, 2006).

FIGURA 3 – MODELO ESQUEMÁTICO DA PAREDE CELULAR DO *M. leprae*

FONTE: Adaptado de VISSA, V. D; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. 1023.2, aug. 2001.

NOTA: A membrana plasmática é envolvida pela parede celular formada de peptidoglicano covalentemente ligado a arabinogalactana. Três cadeias ramificadas da arabinana são ligadas a galactana. Os ácidos micólicos são ligados aos terminais das cadeias arabinana para formar o folheto interno de uma bicamada pseudolipídica. O folheto externo é formado por formado pelos ácidos micólicos monomicolatos de trealose (TMM) e ácidos micocerosóico de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolípídios fenólicos (PGLs). A cápsula presumivelmente composta de PGLs e outras moléculas como PDIMs, monossídeos de fosfatidilinositol e fosfolípídios envolve a bactéria. Lipoglicanas como monossídeos de fosfatidilinositol, lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) ancorados na membrana plasmática, são também encontrados na camada capsular.

Cultivo: *M. leprae* não é cultivado em meios de cultura artificiais, mas, pode ser mantido em culturas axênicas, que conferem um estado metabólico estável por poucas semanas (SCOLLARD *et al.*, 2006). A temperatura ótima de crescimento do bacilo é de 30°C (VAN BEERS; WIT; KLATSER, 1996).

Várias espécies de animais já foram inoculadas como *M. leprae*, entre eles camundongos e tatus (MADEIRA; ROSA, 2000). SHEPARD (1960) conseguiu multiplicação muito lenta do *M. leprae*, inoculando-o no coxim da pata do camundongo. Em camundongo, o bacilo se divide em 12 a 14 dias (VAN BEERS;

WIT; KLATSER, 1996). Grande progresso relativo à transmissão experimental do *M. leprae* foi a obtenção de infecção disseminada, descrita por KIRCHHEIMER e STORRS (1971), com a inoculação de tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*).

No entanto, a propagação de *M. leprae* é restrita a modelos animais, incluindo tatu, e camundongos normais, atímicos ou nocaute. Estes sistemas têm fornecido recursos básicos para estudos genéticos, metabólicos e antigênicos do bacilo. O crescimento de *M. leprae* em coxim plantar de camundongo também fornece ferramentas para avaliar a viabilidade da bactéria e testar a suscetibilidade a drogas de isolados clínicos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Genoma: A comparação do genoma de *M. leprae* com o genoma de *M. tuberculosis* sugere que *M. leprae* sofreu um caso extremo de evolução reduativa. Isto é refletido pelo menor genoma (3.3 Mb para *M. leprae* versus 4.4 Mb para *M. tuberculosis*) e uma maior redução no conteúdo G + C (57,8% para *M. leprae* versus 65,6% para *M. tuberculosis*) (tabela 6). 49,5% do genoma de *M. leprae* corresponde a genes codificantes para proteínas, enquanto, 27% são formados por pseudogenes reconhecíveis. Os restantes 23,5% do genoma parece não ser codificante e pode corresponder a seqüências regulatórias ou genes residuais mutados a ponto de se tornarem irreconhecíveis (COLE *et al.*, 2001).

TABELA 6 – GENÔMICA COMPARATIVA DE *M. leprae* e *M. tuberculosis*

PARÂMETRO	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma (pb)	3.268.203	4.411.532
Nº de genes codificantes para proteínas	1.604	3.959
Nº de pseudogenes	1.116	6
Genes codificantes para proteínas (%)	49,5	90,8
Conteúdo G + C (%)	57,79	65,61

FONTE: COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007, feb. 2001.

A distribuição dos 1.116 pseudogenes é essencialmente aleatória em todo o genoma. Dos 1.604 genes potencialmente ativos, 1.439 são comuns a ambos os patógenos. Entre os 165 genes com nenhum ortólogo em *M. tuberculosis*, para 29 podem ser atribuídas funções. As 136 seqüências codificantes restantes em *M.*

leprae, os quais não mostram nenhuma similaridade com genes conhecidos, podem representar pseudogenes (COLE *et al.*, 2001).

Na classificação de proteínas em famílias, os maiores grupos funcionais estão envolvidos no metabolismo e modificação de ácidos graxos e policetídeos, transporte de metabólitos, síntese do envelope celular e regulação gênica. A evolução reductiva, decaimento de genes e redução do genoma eliminaram vias metabólicas junto com seus circuitos regulatórios e funções acessórias, particularmente aquelas envolvidas no catabolismo (EIGLMEIER *et al.*, 2001).

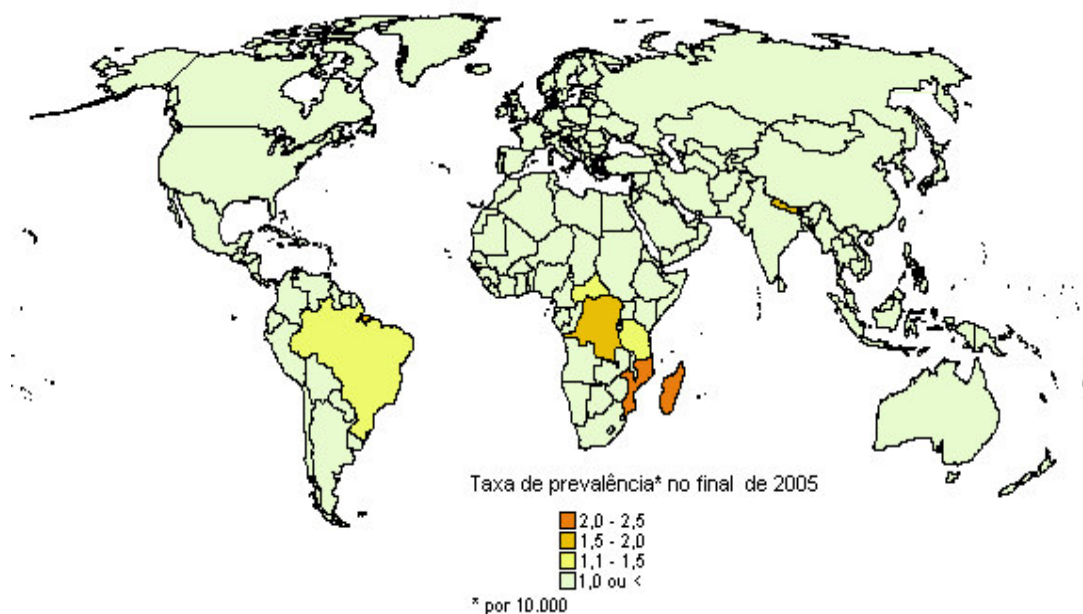
Estas observações ímpares do genoma de *M. leprae* podem ajudar a explicar características marcantes do bacilo, tais como o fato de ser um parasita intracelular obrigatório, seu longo tempo de duplicação e sua incapacidade de cultivo *in vitro* (COLE *et al.*, 2001).

3.2.3 Epidemiologia

3.2.3.1 Distribuição geográfica

A hanseníase é um problema de saúde pública, ou seja, sua taxa de prevalência é maior que 1 em 10.000 habitantes, em quatro países da África, um país do Sudeste Asiático e um país da América Latina. Estes países são: República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Tanzânia, Nepal e Brasil (OMS, 2006). Ver figura 4 e tabela 7.

FIGURA 4 – TAXA DE PREVALÊNCIA NO FINAL DE 2005



FONTE: OMS. **Leprosy:** prevalence rates at end 2005. Disponível em: <http://who.int.lep/situation/PrateEnd2005v2-WM2.pdf> Acesso em: 01 nov. 2006.

TABELA 7 – PAÍSES QUE AINDA NÃO ATINGIRAM A META DE ELIMINAÇÃO

PAÍS	PREVALÊNCIA REGISTRADA			Nº DE NOVOS CASOS DETECTADOS		
	Início de 2004	Início de 2005	Início de 2006	Durante 2003	Durante 2004	Durante 2005
Brasil	79.908 (4.6)	30.693 (1.7)	27.313 (1.5)	49.206 (28.6)	49.384 (26.9)	38.410 (20.6)
República Democrática do Congo	6.891 (1.3)	10.530 (1.9)	9.785 (1.7)	7.165 (13.5)	11.781 (21.1)	10.737 (18.7)
Madagascar	5.514 (3.4)	4.610 (2.5)	2.094 (1.1)	5.104 (31.1)	3.710 (20.5)	2.709 (14.6)
Moçambique	6.810 (3.4)	4.692 (2.4)	4.889 (2.5)	5.907 (29.4)	4.266 (22.0)	5.371 (27.1)
Nepal	7.549 (3.1)	4.699 (1.8)	4.921 (1.8)	8.046 (32.9)	6.958 (26.2)	6.150 (22.7)
Tanzânia	5.420 (1.6)	4.777 (1.3)	4.190 (1.1)	5.279 (15.4)	5.190 (13.8)	4.237 (11.1)
Total	112.092	60.001	53.192	80.707	81.289	67.614

FONTE: WHO. Global leprosy situation, 2006. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 81. n. 32, p. 313, aug. 2006.

NOTAS: Taxa de prevalência é mostrada entre parênteses (número de casos em 10.000 habitantes). Taxa de detecção é mostrada entre parênteses (numero de casos em 100.000 habitantes).

Em 2005, além destes seis países, a hanseníase era um problema de saúde pública, em Angola, República Centro Africana e Índia (OMS, 2005).

A redução significativa relatada na prevalência registrada no Brasil de 2004 a 2005 é resultado da atualização do registro de pacientes e padronização de definições de caso (OMS, 2005).

A tabela 8 mostra as taxas de prevalência e detecção por região no Brasil no ano de 2005. As regiões com maiores taxas são Norte, Nordeste e Centro-Oeste.

TABELA 8 – TAXAS DE PREVALENCIA E DETECÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL EM 2005 POR REGIÃO

REGIÃO	TAXA DE PREVALÊNCIA	PARÂMETRO	TAXA DE DETECÇÃO	PARÂMETRO
Norte	4,02	Médio	5,63	Hiperendêmico
Nordeste	2,14	Médio	3,07	Muito alto
Sudeste	0,60	Baixo	0,88	Médio
Sul	0,53	Baixo	0,69	Médio
Centro-Oeste	3,30	Médio	4,41	Hiperendêmico
Brasil	1,48	Médio	2,09	Muito alto

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano nacional de eliminação da hanseníase em nível municipal 2006-2010**. Brasília: Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase, 2006.

A prevalência global registrada no início de 2006 foi de 219.826 casos e o número de novos casos relatados durante 2005 foi de 296.499. A detecção global de novos casos continua mostrar um declínio acentuado: o número de novos casos relatados diminuiu mais que 110.000 casos (27%) durante 2005 comparado com o número de novos casos durante 2004 (OMS, 2006) (tabela 9).

TABELA 9 – TENDÊNCIAS NA DETECÇÃO DE NOVOS CASOS ENTRE 2001-2005, POR REGIÃO

REGIÃO	Nº DE NOVOS CASOS DETECTADOS DURANTE O ANO				
	2001	2002	2003	2004	2005
África	39.612	48.248	47.006	46.918	42.814
América	42.830	39.939	52.435	52.662	41.780
Sudeste da Ásia	668.658	520.632	405.147	298.603	201.635
Mediterrâneo Ocidental	4.758	4.665	3.940	3.392	3.133
Pacífico Ocidental	7.404	7.154	6.190	6.216	7.137
TOTAL	763.262	620.638	514.718	407.791	296.499

FONTE: WHO. Global leprosy situation, 2006. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 81. n. 32, p. 313, aug. 2006.

A modelagem matemática do declínio potencial na incidência e prevalência da hanseníase sugere que a doença permanecerá um grande problema de saúde pública por várias décadas (SCOLLARD *et al.*, 2006).

3.2.3.2 Transmissão

O mecanismo preciso da transmissão do *M. leprae* é desconhecido (SCOLLARD *et al.*, 20006). A principal via de eliminação do bacilo pelo doente de hanseníase e a provável via de entrada do bacilo no organismo é a via respiratória (particularmente o nariz). A pele é também uma possível porta de entrada e saída do bacilo. Os pacientes com hanseníase lepromatosa não tratados podem eliminar grande número de bactérias de suas úlceras ou pele injuriada. Porém, é possível que a pele seja uma porta de entrada apenas em inoculações acidentais e não há evidências que *M. leprae* pode penetrar em pele íntegra (VAN BEERS; WIT; KLATSER, 1996). Há outra possibilidade, como a transmissão através de insetos. Indivíduos que estão em contato direto com paciente de hanseníase têm grande chance de adquirir a doença. Geralmente, o contato direto está relacionado à dose de infecção que por sua vez está relacionada à ocorrência da doença. Das várias situações que promovem contato entre indivíduos doentes e sadios o domiciliar é o mais facilmente identificado (OMS, 2006).

Os únicos reservatórios naturais conhecidos do bacilo são o homem e o tatu, apesar do relato de animais selvagens naturalmente infectados como o chimpanzé (DONHAM; LEININGER, 1977) e macaco *sooty mangabey* (MEYERS; GORMUS; WALSH, 1992).

Os pacientes multibacilares, que abrigam um grande número de bacilos, são a principal fonte de infecção da doença. A hanseníase pode atingir pessoas de todas as idades e de ambos os sexos. O período de incubação para o desenvolvimento de hanseníase, apesar de sugerido por diversos autores, é desconhecido, e pode variar de meses a 30 anos (GODAL, 1978; VAN BEERS, WIT, KLATSER, 1996; BRITTON, LOCKWOOD, 2004). Fatores ambientais e associados ao hospedeiro são envolvidos no desenvolvimento da hanseníase, como contatos domiciliares, fatores genéticos (ver 3.2.4), fatores socioeconômicos e vacinação BCG (VAN BEERS; WIT; KLATSER, 1996). Evidências indicam que imunossupressão terapêutica extensa confere aos indivíduos alta suscetibilidade a infecção com *M. leprae*, mas que em indivíduos HIV positivos há resposta do hospedeiro ao *M. leprae* comparável àquela de indivíduos não HIV infectados, mesmo quando a infecção com HIV progride e o número de células CD4⁺ circulantes diminui. A experiência com terapia antiretroviral altamente ativa sugere que em áreas endêmicas de hanseníase, a infecção subclínica e infecção clínica inicial com *M. leprae* pode ser mais predominante entre indivíduos HIV positivos do que geralmente é reconhecido. Além disso, parece que a restauração da função imune após terapia antiretroviral altamente ativa pode ser associada com o desenvolvimento de reações tipo 1 (SCOLLARD *et al.*, 2006).

3.2.4 Genética da Suscetibilidade do Hospedeiro à Hanseníase

Na maioria das doenças infecciosas apenas uma proporção dos indivíduos expostos a um patógeno tornam-se infectados e desenvolvem clinicamente doença. Ao menos em parte, esta variabilidade interindividual é determinada pelo efeito combinado de proteínas do hospedeiro codificadas por uma série de genes que controlam a quantidade e qualidade da interação parasita-hospedeiro e a conseqüente resposta imune. A identificação dos mais importantes genes de suscetibilidade/resistência do hospedeiro permitirá um melhor entendimento da

patogênese das doenças infecciosas e provavelmente facilitarão o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Várias estratégias podem ser usadas para mapear e identificar genes de suscetibilidade a doenças infecciosas do hospedeiro. Três dos mais usados são: modelos experimentais animais, estudo de genes candidatos e varreduras genômicas (MARQUET; SCHURR, 2001).

Entre os genes ou regiões cromossômicas implicadas na modulação da suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase estão:

HLA (*Human Leukocyte Antigen*): VAN EDEN *et al.* (1980) observaram uma herança preferencial significativa de variantes HLA-DR2 entre irmãos afetados com hanseníase tuberculóide, mas não entre irmãos saudáveis ou afetados com hanseníase lepromatosa. Outros autores como IZUMI *et al.* (1982) associaram variantes HLA-DR2 com hanseníase tuberculóide e lepromatosa. KIM *et al.* (1987) detectaram os antígenos HLA-DR1, DR2, DRw9 e DQw1 em frequência maior nos pacientes de hanseníase lepromatosa e tuberculóide que no grupo controle. TODD, WEST e McDONALD (1990) encontraram que os antígenos HLA-DR2 e DQw1 estavam associados com ambas as formas lepromatosa e tuberculóide da hanseníase. VAN EDEN *et al.* (1985) observaram que HDL-DR3 foi herdado preferencialmente por crianças com hanseníase tuberculóide em vez de hanseníase lepromatosa e que a suscetibilidade a hanseníase *per se* é provavelmente não controlada por genes ligados ao HLA.

TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*): RAJALINGAM, SINGAL e MEHRA (1997) associaram alelos do gene do TAP2-B com a hanseníase tuberculóide em um estudo aplicado a uma população do norte da Índia.

TNF (*Tumor Necrosis Factor*): ROY *et al.* (1997) relataram uma alta frequência do alelo *TNF2* em pacientes com hanseníase lepromatosa na Índia.

NRAMP1 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*): ABEL *et al.* (1998) realizaram um estudo em 168 pacientes de 20 famílias do Sudoeste Asiático e verificaram significativa ligação entre a hanseníase *per se* e haplótipos de marcadores intragênicos ao gene *NRAMP1*.

VDR (*Vitamin D Receptor*): A análise de polimorfismo *TaqI* na região 3' do gene *VDR* mostrou que a distribuição dos genótipos entre os grupos controle,

lepromatoso e tuberculóide foram diferentes. Na hanseníase tuberculóide o genótipo *tt* foi encontrado em frequência significativamente mais alta que no grupo controle. Em contraste, o genótipo *TT* foi encontrado em frequência maior no grupo com hanseníase lepromatosa comparado com o grupo controle. Os heterozigotos do genótipo *Tt* foram encontrados em menor frequência em ambos os tipos de hanseníase do que no grupo controle (ROY *et al.*, 1999).

Cromossomo 10p13: SIDDIQUI *et al.* (2001) identificaram uma região em ligação com suscetibilidade à hanseníase no cromossomo 10 em uma população do sul da Índia. Segundo SCOLLARD *et al.* (2006) a maioria dos pacientes nestas famílias tinha hanseníase tuberculóide (paucibacilar) e não está claro se o locus que foi identificado está associado à hanseníase *per se* ou apenas à hanseníase tuberculóide. Neste contexto, MIRA *et al.* (2003), estudando uma população vietnamita, confirmaram que o locus no cromossomo 10p13 está envolvido apenas na hanseníase paucibacilar.

Cromossomo 20p12: TOSH *et al.* (2002) identificaram uma região de ligação no cromossomo 20 (20p12) como um locus de suscetibilidade em uma população recrutada em Tamil Nadu, região do Sul da Índia. Porém, esta região do cromossomo não pareceu ser ligada entre as famílias de Andhra Pradesh, outra região do Sul da Índia.

Cromossomo 6q25: MIRA *et al.* (2003) identificaram forte evidência de ligação entre hanseníase *per se* (hanseníase independente de apresentações clínicas específicas) e a região cromossômica 6q25-q27 em um painel de 86 famílias afetadas com hanseníase do Vietnam do Sul.

PARK2/PACRG: Utilizando análise de ligação baseada em famílias, MIRA *et al.* (2004) investigaram mais além a região do cromossomo 6q25-26, previamente ligada a suscetibilidade à hanseníase (MIRA *et al.*, 2003) e indentificaram variações dos genes *PACRG* e *PARK2* associadas com um risco maior de hanseníase. Inicialmente a análise foi aplicada a 197 famílias vietnamitas independentes; em seguida, os resultados foram replicados em uma segunda amostra caso-controle de 975 indivíduos do Brasil (587 pacientes com hanseníase e 388 controles).

3.2.5 Reação de Mitsuda

A mitsudina, nome adotado no Brasil para a lepromina, é uma suspensão esterilizada de *M. leprae* mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas de pacientes virchowianos ou de tecidos de tatu infectados por *M. leprae*. Quando a mitsudina é obtida de hansenomas, ela é denominada mitsudina H, para indicar a origem humana. No caso de ser extraída de tecidos de tatu, ela é denominada mitsudina A. A denominação mitsudina foi adotada no Brasil para homenagear Kensuke Mitsuda, o primeiro a relatar, na III Conferência Internacional de Hanseníase, realizada em 1923, em Estrasburgo, os resultados das experiências em larga escala como a suspensão de *M. leprae*, que ele vinha fazendo.

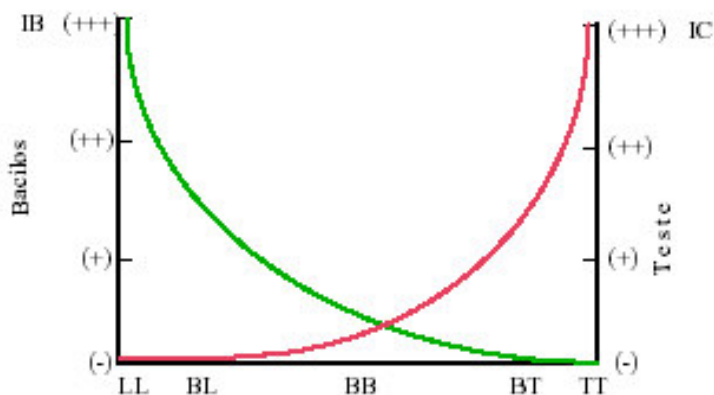
Atualmente, a preparação da mitsudina obedece às normas de padronização e segurança recomendadas pela OMS para a escolha e processamento de tecidos utilizados para a extração dos bacilos, testes de esterilidades, inocuidade, reatividade cutânea, conteúdo total de proteína, conteúdo total de fenol e contagem de bacilos cuja concentração deve variar entre 40 a 160 milhões por mililitro (BEIGUELMAN, 2002).

A injeção intradérmica na face anterior do antebraço de mitsudina pode provocar uma reação precoce, que é lida entre 24 a 72 horas após a inoculação desta suspensão, conhecida como reação de Fernandez, e uma reação tardia, realizada entre 21^o e 28^o dias após a inoculação, que é denominada reação de Mitsuda. Esta reação é expressa em milímetros, tomando-se a média das medidas longitudinal e transversal da induração, e é considerada positiva quando ultrapassa 5 mm (TOMIMORI-YAMASHITA *et al.*, 1996.)

A reação de Mitsuda não é útil para o diagnóstico da hanseníase, pois 90% das pessoas adultas sadias são Mitsuda-positivo (SCHNITZLER, 1991). A reação de Mitsuda é utilizada para a classificação da hanseníase e avaliação da resposta imune ao *M. leprae* (OPAS, 1983). A reação de Mitsuda positiva está associada à forma tuberculóide, e a reação negativa, à forma lepromatosa da doença. (OPRAMOLLA, 2000). Na forma tuberculóide (TT) há uma vigorosa resposta celular, enquanto a forma lepromatosa (LL) está associada a uma potente resposta humoral. Nos pacientes *borderline*, *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e

borderline-lepromatoso (BL), a progressiva redução da resposta imune mediada por células é acompanhada por aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (figura 5) (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

FIGURA 5 – ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE



FONTE: Adaptado de GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 367, jul./ago. 2002.

NOTAS: A imunidade celular (IC) medida pelo teste de Mitsuda é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópio (IB).

TT: forma tuberculóide; LL: forma lepromatosa; BT, BB, BL: grupo *borderline*.

As células T que produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN- γ) são chamadas Th1 e aumentam a imunidade mediada por células. IFN- γ ativa macrófagos e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em uma doença mais localizada, que pode evoluir para a cura (pólo tuberculóide). Células T que produzem IL-4, IL-5 e IL-10 são chamadas Th2, e aumentam a resposta humoral. IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem a ativação de macrófagos resultando em infecção progressiva (pólo lepromatoso).

Análise de clones de células T derivadas de lesões de pacientes com hanseníase tem revelado que diferentes padrões de citocinas encontradas em lesões cutâneas são produzidas por subclasses de CD4⁺ e CD8⁺ predominantes nestas lesões. Clones CD4⁺ de pacientes TT produzem altos níveis de IFN- γ , IL-2 e níveis indetectáveis de IL-4. Esses clones, que também são deficientes na atividade

helper para a formação de anticorpo, foram designados como células T CD4⁺ tipo 1, favorecedores da imunidade mediada por células. Clones de CD8⁺ derivadas de lesões LL, produzem altos níveis de IL-4 *in vitro* e baixos níveis de IFN- γ . Considerando o padrão de secreção de citocinas dessas células T-supressoras, particularmente de IL-4 estes clones de células foram designados como células T CD8⁺ tipo 2, contribuindo para o aumento da produção de anticorpos (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

3.2.6 Sinais e Sintomas

A hanseníase manifesta-se através de sinais e sintomas dermatoneurológicos que podem levar à suspeição e ao diagnóstico clínico da doença. A doença, geralmente, manifesta-se através de lesões de pele com diminuição ou ausência de sensibilidade. As lesões mais comuns são: manchas esbranquiçadas ou avermelhadas, pápulas, infiltrações, tubérculos e nódulos.

A alteração da sensibilidade é causada pelo acometimento de ramos sensitivos cutâneos. A sensibilidade nas lesões pode ser diminuída (hipoestesia), ou ausente (anestesia). Na fase inicial da lesão, porém, pode haver um aumento da sensibilidade (hiperestesia) acompanhada de uma sensação de formigamento.

A hanseníase manifesta-se, não apenas através de lesões de pele, mas, principalmente, através de lesões nos troncos nervosos periféricos. Essas lesões são decorrentes de processos inflamatórios dos nervos periféricos (neurites), causados tanto pela ação direta do bacilo nos nervos, como pela reação do organismo ao bacilo (reações hansênicas). Elas se manifestam através de dor e/ou espessamento dos nervos periféricos; diminuição e/ou perda de sensibilidade nas áreas inervadas por esses nervos, principalmente nos olhos, mãos e pés; diminuição e/ou perda de força nos músculos inervados por esses nervos, principalmente pálpebras e nos membros superiores e inferiores.

Em alguns casos de neurite, ocorre espessamento de nervos periféricos, alteração de sensibilidade e alterações motoras sem sintomas agudos de dor.

A ação do bacilo nos nervos periféricos causa incapacidades, tais como mãos e pés insensíveis, que possibilitam a ocorrência de queimaduras, ferimentos,

úlceras, fissuras, etc., predispondo à infecções que podem destruir as estruturas da pele, dos músculos, dos ossos e provocar deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

3.2.7 Classificação

A classificação de Madri (1953) divide a hanseníase em: tuberculóide (T), lepromatosa (L), indeterminada (I) e em *borderline* ou dimorfa (B). Os quatro critérios que definem a classificação da doença, nesta ordem, são:

1. **Clínico:** compreende a morfologia das lesões de pele e manifestações neurológicas.
2. **Bacteriológicos:** envolve o exame de esfregaços de lesões de pele e mucosa nasal.
3. **Imunológico:** reação à lepromina.
4. **Histopatológico:** aspectos histopatológicos das lesões (INTERNATIONAL CONGRESS LEPROLOGY, 6., 1953).

As formas clínicas da hanseníase, na classificação de Madri (1953), considerando-se aspectos bacteriológicos e resposta à intradermoreação de Mitsuda, estão relacionados na tabela 10.

TABELA 10 - FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE RELACIONADAS COM BACILOSCOPIA E REAÇÃO DE MITSUDA, SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE MADRI

	Indeterminada (I)	ou	Tuberculóide (T)	<i>Borderline</i> (B)	a	Lepromatosa (L)
Reação de Mitsuda	Positiva negativa		Fortemente positiva	Negativa positiva fraca		Negativa
Baciloscopia	Negativa		Negativa	Positiva a raros bacilos		Positiva

FONTE: Adaptado de SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 326, jul./set. 1997.

RIDLEY e JOPING (1966) propuseram uma classificação para formas clínicas da hanseníase, segundo rígidos critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos. Segundo estes autores, a hanseníase pode ser

classificada em cinco grupos: tuberculóide-tuberculóide (TT), lepromatosa-lepromatosa (LL), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatosa (BL). Pacientes que não se enquadram em nenhum dos cinco grupos acima são definidos com portadores de hanseníase indeterminada.

Em 1982, o Grupo de Estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS) para quimioterapia em programas de controle recomendou uma classificação para hanseníase baseada na classificação de Ridley-Jopling e na carga bacteriana em esfregaços de linfa. Nesta classificação, criada essencialmente para fins terapêuticos, os pacientes TT e BT com índice bacteriológico (BI) $\leq 2+$ foram classificados como doença paucibacilar e BB, BL e LL com BI $> 2+$ foram classificados como doença multibacilar. O IB reflete o número de bacilos ácido-resistentes por média dos campos microscópicos imersos em óleo e é expresso em uma escala semilogarítmica de 0 a 6+.

Em 1988, o Comitê Técnico em Hanseníase da OMS recomendou que qualquer paciente com esfregaço positivo fosse classificado como doença multibacilar. Em 1998, este Comitê declarou que os esfregaços não eram essenciais para dirigir o tratamento e que o número de lesões presentes deveria ser a base para a classificação. As normas para diagnóstico clínico recomendadas foram: pacientes que não sofrem de reações e possuem menos de cinco lesões são classificados como doença paucibacilar (PB) e aqueles com mais de cinco lesões são classificados como multibacilar (MB) (MOSCHELLA, 2004).

As classificações adotadas para as formas clínicas da hanseníase, a de Madri, a de Ridley e Jopling e da OMS, podem ser correlacionadas, como mostrado na tabela 11.

No Brasil, usa-se o termo “virchowiana” para referir-se a hanseníase lepromatosa ou a hanseníase lepromatosa-lepromatosa, uma homenagem a Virchow, que descreveu as células espumosas encontrada na hanseníase.

TABELA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CLASSIFICAÇÕES DE MADRI (1953), DE RIDLEY E JOPLING (1966) E DA OMS (1982) ADOTADAS PARA A HANSENÍASE

Madri	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	<i>Borderline</i> (B)	Lepromatosa (L)
Ridley e Jopling	I	TT	BT	BB BL LL
OMS	Paucibacilares			Multibacilares

FONTE: Adaptado de SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 326, jul./set. 1997.

NOTA: TT: tuberculóide-tuberculóide; BT: *borderline*-tuberculóide; BB *borderline-borderline*; BL: *borderline*-lepromatoso e LL: lepromatoso-lepromatoso.

3.2.8 Manifestações Clínicas e Reações

3.2.8.1 Manifestações clínicas

3.2.8.1.1 Hanseníase indeterminada

Essa forma clínica se caracteriza por áreas circunscritas da pele ou máculas com distúrbios de sensibilidade e anidrose ou hipoidrose. Pode ocorrer queda de pêlos no local. Não há comprometimento de troncos nervosos e, por isso, não ocorrem alterações motoras ou sensitivas que possam causar incapacidades.

As máculas são hipocrômicas ou eritemato-hipocrômicas e, nestas últimas, com freqüência, o eritema se localiza apenas na sua periferia (máculas eritemato hipocrômicas com eritema marginal).

O seu tamanho varia, havendo lesões minúsculas, de 1 ou 2 cm, e outras maiores de 4 cm ou mais, e se localizam mais freqüentemente na face, superfície de extensão dos membros, tronco e nádegas. O número também é variável, havendo casos com uma única lesão, outros com duas ou três e alguns com um número relativamente grande delas.

A baciloscopia de rotina nesses casos é negativa e o teste de Mitsuda pode ser positivo ou negativo (OPROMOLLA, 2000).

Do ponto de vista histopatológico, as lesões apresentam alterações de processo inflamatório crônico inespecífico, constituídas por pequenos infiltrados linfo-histiocitários perivasculars, perifoliculares, periglandulares e perineurais, com

bacilos ausentes ou presentes em pequeno número nos filetes nervosos (SCHNITZLER, 1991).

Quanto a sua evolução, as manifestações clínicas podem desaparecer espontaneamente ou evoluir para as outras formas da doença, de acordo com as características imunológicas do paciente (OPROMOLLA, 2000).

3.2.8.1.2 Hanseníase tuberculóide

As lesões tuberculóides podem ser planas, mas apresentando certa consistência, ou elevadas formando placas bem individualizadas. As primeiras caracterizam a variedade macular da hanseníase tuberculóide.

As placas tuberculóides podem ser cheias, isto é, toda a lesão está elevada, ou apresentam apenas a periferia infiltrada formando um bordo de largura variável. Esse bordo não é liso, mas constituído por pequenas pápulas que se agrupam e lhe dão aspecto granitado. O limite das lesões tuberculóides, com a pele normal, é bem nítido.

Essas lesões apresentam uma cor castanha ou castanho-violácea e, quando ela é eritemato-pardacenta, com predomínio do tom eritematoso, provavelmente as lesões estão sofrendo uma reação tipo 1. Quando existe um área central plana, ela quase é hipocrômica, mas às vezes parece normal.

As placas tuberculóides podem apresentar formas variáveis. Na maioria das vezes, são circulares ou anulares, mas podem apresentar aspecto irregular, dito geográfico. Quando há um número maior de lesões, elas podem confluir formando lesões circinadas. As placas são de tamanhos diversos e podem ter a dimensão de uma cabeça de alfinete como acontece na hanseníase nodular da infância, ou serem numulares, ou aprestarem quatro ou mais centímetros de diâmetro. Há, raramente, lesões extensas que comprometem parte do tronco ou de segmentos de membros.

As alterações sensitivas são, em geral, bastante pronunciadas nas lesões tuberculóides, havendo quase sempre anidrose e perda de pêlos. Não é infreqüente se observar um ramo nervoso emergindo de uma placa tuberculóide caracterizando as lesões “em raquete de tênis”.

Freqüentemente, somente um único nervo está lesado, mas dependendo de qual está acometido, como o ulnar, por exemplo, ele pode dar origem a incapacidades graves.

Além das lesões “em raquete”, um outro comprometimento característico do tipo tuberculóide é chamado “abscesso de nervo”.

A baciloscopia nos casos tuberculóides crônicos é sempre negativa e a reação de Mitsuda é fortemente positiva com ulceração ou não. Histopatologicamente esses casos se caracterizam pela formação de granulomas tuberculóides.

Há uma variedade de casos tuberculóides chamada hanseníase nodular da infância. Nesta variedade, as lesões ocorrem em crianças na faixa etária de uma a quatro anos, podendo ocorrer pouco mais tarde. As lesões em geral são pápulas ou nódulos, pequenas, únicas ou em pequeno número ocorrendo na face e outras localizações. Elas regredem espontaneamente, ao redor de cinco a seis meses e deixam no local uma pequena área atrófica. Essas lesões não apresentam bacilos ou eles são evidenciados em pequeno número. Não há comprometimento de troncos nervosos e não se consegue evidenciar alterações da sensibilidade ao nível das lesões. Do ponto de vista imunológico, a reação de Mitsuda é positiva e o substrato histopatológico também é constituído por granulomas epitelióides. Essas lesões nodulares são observadas em crianças filhas de pais com hanseníase virchowiana e são consideradas raras, talvez pelo fato de não se examinar com freqüência, crianças nessa faixa etária (OPROMOLLA, 2000).

3.2.8.1.3 Hanseníase virchowiana

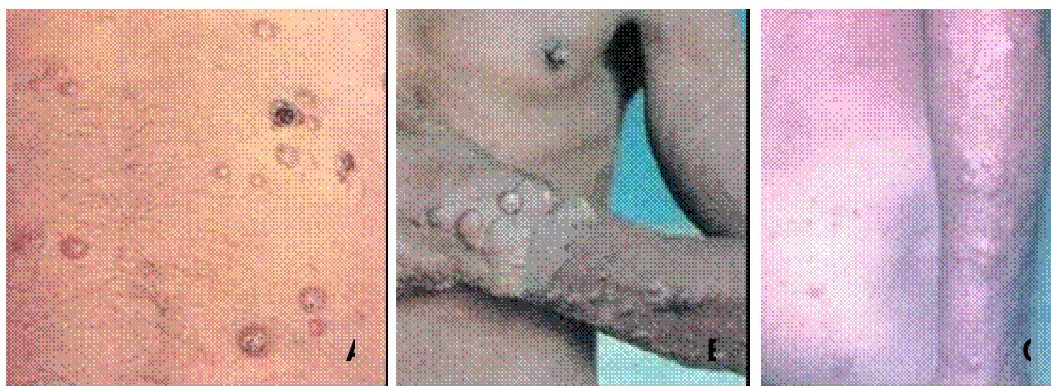
As primeiras manifestações do tipo virchowiano são máculas clinicamente indeterminadas, que progressivamente se tornam lesões virchowianas fracas.

Nas formas indeterminadas que irão evoluir para esse pólo anérgico da doença, há sempre um número grande de máculas hipocrômicas que confluem atingindo grandes extensões do tegumento, passando o indivíduo doente a apresentar uma hipocromia difusa. Antes de confluírem ou de aumentar muito o seu número, as máculas já passaram por um estágio em que eram clinicamente

indeterminadas, mas já apresentavam do ponto de vista histopatológico discretos infiltrados histiocitários na derme com bacilos que acabam sendo detectados em esfregaços de rotina. Posteriormente, sobrevem eritema difuso sobre essa hipocromia e, a seguir, provavelmente pelo aumento do número de bacilos, ocorre o aparecimento de uma pigmentação que dá à pele um tom ferruginoso.

As lesões, então, se infiltram difusamente e nos locais em que essa infiltração for mais acentuada podem se formar pápulas, tubérculos, nódulos e placas que são denominados genericamente de hansenomas (figura 5). Elas aparecem, em geral, em pequeno número de cada vez, e lentamente podem aumentar de tamanho.

FIGURA 6 – HANSENOMAS



FONTE: **A e B**, SCHNITZLER, R. Hanseníase. In: AMARO NETO, V.; BALDY, J. L. da. S. 3. ed. rev. e amp. **Doenças transmissíveis**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 460. **C**, OPRMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p.124.

Devido à infiltração de áreas pilosas, como supercílios, cílios, região da barba e outras áreas do tegumento, há queda total ou parcial dos pêlos. A queda de sobrancelhas e a de cílios é denominada madarose. Os cabelos, na maioria das vezes, estão aparentemente conservados, mas em várias ocasiões notam-se áreas semi-alopécicas “em clareira”. O fato dos cabelos permanecerem não significa que o couro cabeludo não esteja infiltrado pela doença. Pacientes, com a pele da face muito infiltrada e conservação dos cabelos, diz-se que possuem fácies leonina.

Na hanseníase virchowiana não há resistência à disseminação bacilar. Da mesma forma que a doença se dissemina na pele, o faz também para as mucosas, ossos, vasos sanguíneos, nervos e algumas vísceras.

A mucosa nasal é comprometida e o indivíduo doente apresenta infiltrações ao nível do septo cartilaginosos e, às vezes, a presença de hansenomas que tornam a mucosa congesta dificultando a respiração do paciente e causando epistaxis. Pode haver perfuração do septo nasal com a deformidade conseqüente.

Há também lesões amigdalíneas da mucosa bucal, e o palato mole, palato duro, pilares e língua podem apresentar infiltrações e hansenomas. As gengivas, aparentemente, são pouco comprometidas, mas há lesões periodontais. A infiltração pode se estender à laringe e o paciente apresenta ronquidão e dispnéia nos casos avançados.

Os ossos e articulações são atingidos com freqüência e costumam ocorrer osteítes, lesões líticas e comprometimento de sinóvias. Na face, além da destruição da espinha nasal, pode haver a erosão de outros ossos como o processo alveolar do maxilar que leva à queda dos incisivos superiores. Em geral, observam-se, do ponto de vista histológico, bacilos dentro do endotélio dos capilares da derme, mas também ocorre o comprometimento das grandes veias cutâneas superficiais dos antebraços e pernas, causando a obstrução desses vasos. Há uma panflebite virchowiana, com envolvimento de todas as camadas das veias e isto se apresenta macroscopicamente como cordões endurecidos palpáveis e até visíveis.

O comprometimento neural é discreto, nos casos iniciais, mas, à medida que a doença vai se agravando, as lesões se tornam mais acentuadas e evidentes.

Os nervos envolvidos no processo são mais freqüentemente o ulnar, mediano, o fibular e o tibial posterior. Diferente de outras formas clínicas, esse comprometimento, além de extenso, é pouco intenso.

As vísceras mais freqüentemente atingidas são o fígado, baço, suprarrenais e testículos. As lesões testiculares causam o aparecimento de ginecomastia e perda da potência sexual. O globo ocular é outro órgão comumente comprometido, podendo apresentar lesões na córnea, íris e corpo ciliar. Diminuição da acuidade visual e, mesmo a cegueira, são conseqüências desse comprometimento, principalmente quando ocorrem reações no órgão.

Os virchowianos são os casos contagiantes e suas lesões albergam grande quantidade de bacilos. A ausência de uma imunidade específica contra a invasão do *M. leprae* é demonstrada pela reação de Mitsuda que é negativa. Histologicamente, as lesões virchowianas se traduzem por um infiltrado histiocitário rico em bacilos e pequena quantidade de linfócitos.

Duas variedades de hanseníase virchowiana são referidas mais particularmente que são a hanseníase históide e a hanseníase de Lúcio.

A variedade históide se manifesta com hansenomas de aspecto queloidiano e aparecem em casos em que está havendo uma recidiva da moléstia. As lesões são intensamente bacilíferas e há um grande predomínio de bacilos típicos que seriam resistentes à terapêutica.

A hanseníase de Lúcio é uma variedade de hanseníase virchowiana que foi descrita no México e seria característica desse país. Suas lesões são constituídas por um infiltrado difuso que não altera as feições do paciente, por madarose total superciliar e ciliar, podendo haver desabamento da pirâmide nasal. Há casos de hanseníase de Lúcio que se iniciam com infiltração difusa sem passar pela forma indeterminada (forma primária) e casos que se iniciam passando por essa forma (forma secundária). Nessa variedade, há comprometimento visceral importante, uma grande quantidade de bacilos é detectada em suas lesões, e uma característica marcante desses casos é o aparecimento de um tipo especial de reação aguda antes do início de qualquer tratamento, denominado de fenômeno de Lúcio. A hanseníase de Lúcio, com manifestações reacionais é também designada como “hanseníase manchada de Lúcio”.

3.2.8.1.4 Hanseníase dimorfa

Adotando a nomenclatura dada por Ridley e Jopling, o grupo dimorfo (D) ou *bordeline* (B) inclui: BT (ou DT), BL (ou DL ou DV) e BB (ou DD).

Os DT seriam aqueles casos semelhantes aos tuberculóides. Neles as lesões são maiores, em maior número e, às vezes, podem apresentar algumas das placas com limites pouco nítidos em toda a lesão ou em parte dela. Alguns autores consideram como uma característica das lesões DT as lesões satélites que

aparecem junto a algumas placas. Alguns autores acham que os tuberculóides dificilmente comprometem troncos nervosos e acham que só os DT o fazem, e vários nervos poderiam ser lesados e de maneira assimétrica. Os abscessos de nervo e as lesões “em raquete” seriam características desse grupo de casos.

Nos DT, os bacilos podem ser detectados, às vezes, nos esfregaços de rotina, mas em pequeno número, e a reação de Mitsuda é positiva, mas é menos intensa do que nos tuberculóides. Na histopatologia predominam os granulomas tuberculóides.

Evolutivamente, esses casos têm tendência a cura espontânea, mas muitas vezes com seqüelas neurológicas devido às reações. Há, na evolução, a partir do grupo indeterminado, uma fase “pré-DT” com lesões clinicamente indeterminadas e estrutura tuberculóide.

Os DD são casos que apresentam placas cheias, anulares ou contornos irregulares, com limites pouco precisos. Têm tonalidade ferruginosa quando não estão em reação e aqueles que têm um bordo ferruginoso o centro é plano, liso e hipocrômico, nunca cicatricial. Lesões características desse grupo são aquelas com áreas central circular, hipocrômica, plana, bem delimitada, e com a periferia infiltrada formando um bordo espesso que se difunde gradativamente para a pele aparentemente são circunvizinha. Essas lesões “foveolares”, “esburacadas” também são conhecidas como lesões em “queijo suíço”.

Tem-se a impressão que essas lesões seriam lesões iniciais indeterminadas que passaram para a forma dimorfa DD como lesões pré-DD (cl clinicamente indeterminada e com infiltrado dérmico incipiente DD) e que, uma vez transformadas, começaram a aumentar de tamanho. Quando essas lesões, e as anulares, confluem, dão um aspecto reticulado ao tegumento que concorrem para dar o caráter bizarro que caracterizam essa forma clínica. Os nervos são comprometidos de maneira extensa e intensa principalmente quando esses casos sofrem uma reação tipo 1. A baciloscopia nesse grupo é sempre positiva, a estrutura histológica ainda esboça alguns aspectos tuberculóides e a reação de Mitsuda é negativa.

Os DV englobam todos aqueles casos muito semelhantes aos virchowianos, mas que possuem aspectos que não se enquadram com os desses últimos. Assim,

as lesões são numerosas, com tendência à simetria, a pele em torno delas também está infiltrada, e tem um tom ferruginoso que em algumas lesões se acentua devido a uma maior infiltração adquirindo uma tonalidade mais acastanhada. Às vezes são pápulas, tubérculos e nódulos como verdadeiros hansenomas e se notam lesões com aspecto anular ou figurado. Há casos em que a maioria das lesões é constituída por placas de mais ou menos o mesmo tamanho, assumindo um aspecto monomorfo. Os pacientes virchowianos, nos quais se nota alguma lesão com aspecto dimorfo, são considerados por alguns autores como virchowianos subpolares.

Parece que os DV sofrem menos reações tipo 1 e há aqueles que apresentam eritema nodoso. Alguns têm poucas lesões neurológicas e outros em que elas são múltiplas e com tendência a simetria. Há envolvimento visceral nesses pacientes. Em todos os casos a baciloscopia é intensamente positiva e a reação de Mitsuda é negativa. Os DV podem ser distinguidos dos virchowianos histologicamente (OPROMOLLA, 2000).

3.2.8.2 Reações hansênicas

As reações hansênicas são fenômenos inflamatórios agudos que ocorrem durante a evolução da hanseníase e, elas podem ocorrer em todas as formas clínicas com exceção do grupo indeterminado (OPROMOLLA, 2000).

Acredita-se que as reações sejam mediadas imunologicamente, mas os mecanismos responsáveis para cada tipo de reação permanecem pouco entendidos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Os tipos de reação mais importantes são a reação reversa ou reação tipo 1 e a reação tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (ENH) (ARAÚJO, 2003).

Os estados reacionais são a principal causa de lesões dos nervos e de incapacidades provocadas pela hanseníase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Podem ocorrer antes, durante ou depois do tratamento (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999).

3.2.8.2.1 Reação tipo reversa

Evidências indicam que a reação tipo 1 é o resultado do aumento espontâneo da imunidade mediada por células e da hipersensibilidade tardia aos antígenos de *M. lepae*, mas as causas e mecanismos deste aumento permanecem pouco entendidos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Este tipo de reação ocorre em pacientes *bordeline* (DV, DD e DT) (SCOLLARD *et al.*, 2006). Quando há melhora da imunidade celular a reação é chamada de reação ascendente ou *up-grading* e quando há piora da imunidade celular a reação é chamada de reação descendente ou *down-grading* (MARGARIDO-MARCHESE; TEDESCO-MARCHESE; RIVITTI, 2004).

Na reação reversa, as lesões preexistentes tornam-se eritematovioláceas, sensíveis, intumescidas, elevadas, e máculas tornam-se placas. Ocorre, também, elevação e melhor definição dos limites das lesões. Evoluem com descamação e, por vezes, sobrevém ulceração. Novas lesões tendem a surgir, em áreas adjacentes, assemelhando-se à lesões preexistentes, e podem ser numerosas, pequenas e esparsas. Nos pacientes DV, edema acrofacial pode estar presente, assim como sintomas sistêmicos, como febre e mal-estar, que não são usuais.

O comprometimento neural é comum, por vezes, acentuado e grave, resultando, ocasionalmente, em marcante perda de função e paralisia súbita. Nervos comprometidos tornam-se intumescidos, com graus variáveis de dor, e exacerbação da sensibilidade, local e/ou territorial (SOUZA, 1997). O tronco neural mais comumente acometido é o nervo ulnar na região do cotovelo. A manifestação mais acentuada é o pé caído, que ocorre quando o nervo fibular é acometido (GELBER, 2002).

Segundo OPRAMOLLA (2000) um surto reacional tem uma duração de quatro a seis meses, com ou sem tratamento, se for considerado desde o seu início, período de estado e desaparecimento das lesões.

3.2.8.2.2 Reação tipo 2

A reação ocorre em pacientes com imunidade celular deficiente ao *M. leprae*, abundantes bacilos em lesões nervosas periféricas ou cutâneas e uma resposta a anticorpo policlonal forte com altos níveis de imunoglobulinas circulantes. Autores propuseram que a reação tipo 2 representa um fenômeno mediado por imunocomplexos, mas essa teoria não foi provada nem desaprovada (SCOLLAR *et al.*, 2006).

A reação ocorre em pacientes multibacilares (V e DV) (SCOLLARD *et al.*, 2006). As reações se caracterizam, na pele, pelo aparecimento súbito de nódulos, pápulas e placas eritematosas, dolorosas, em todo o tegumento. Têm como localizações preferenciais, as orelhas, a superfície de extensão dos membros e região lombares, mas podem acometer outros locais. As lesões agudas podem ulcerar, algumas ou todas elas, é o chamado eritema nodose necrotizante.

O ENH é um fenômeno sistêmico, não se restringindo somente à pele. Ele ocorre mais freqüentemente na hanseníase vichoviana que acomete vários órgãos, e todos os lugares onde houver infiltrado específico pode fazer parte do quadro reacional, e mesmo onde não há esse infiltrado.

Em um surto complexo o cortejo sintomático se caracteriza por manifestações prodrômicas, como febre, mal estar, inapetência, artralgias, seguidos por aumento doloroso de linfonodos, aparecimento das lesões cutâneas, irites, iridociclites, neurites, artrites, orquites e orquiepididimites, e aumento doloroso fígado e do baço, caracterizando as hepatoesplenomegalia reacionais.

Um surto reacional tem uma duração de 15 a 20 dias e eles podem ocorrer de maneira irregular ou periodicamente ou ser subintrantes (OPRAMOLLA, 2000).

3.2.9 Diagnóstico

3.2.9.1 Um caso de hanseníase

Na sétima reunião do Comitê Técnico em Hanseníase da OMS em 1997, um caso de hanseníase foi definido como um indivíduo que não completou o tratamento e possui um ou mais dos três sinais:

- Lesões de pele hipopigmentadas ou avermelhadas com perda de sensibilidade;
- Envolvimento dos nervos periféricos como demonstrado por seu espessamento e associada perda de sensibilidade;
- Baciloscopia positiva para bacilos ácido-resistentes (MOSCHELLA, 2004).

3.2.9.2 Diagnóstico da doença

O diagnóstico da hanseníase baseia-se nos sinais clínicos e nos sintomas característicos da doença, ou seja, as lesões ou áreas da pele com alteração de sensibilidade e comprometimento dos nervos periféricos.

O processo de diagnóstico da hanseníase deve ser realizado através do exame clínico e quando disponível o exame baciloscópio deve ser realizado.

O exame clínico tem como propósito fazer a avaliação dermatoneurológica do paciente, buscando identificar os sinais e sintomas característicos da doença, bem como outras intercorrências clínicas. A avaliação dermatológica busca identificar as lesões de pele e pesquisar a sensibilidade dessas lesões, e a avaliação neurológica busca identificar neurites, o comprometimento ou lesões de nervos periféricos e as incapacidades físicas e deformidades, provocadas por essas lesões. Através do exame clínico do paciente são identificados, também os estados reacionais ou reações hansênicas, quando há uma exacerbação dos sinais e sintomas da hanseníase, e é feito o diagnóstico diferencial com outras doenças dermatológicas e neurológicas com sinais e sintomas semelhantes aos da hanseníase.

O exame baciloscópio, ou baciloscopia, é um exame laboratorial que fornece informações sobre a presença do bacilo nas lesões suspeitas. Quando disponível, deve ser utilizado como apoio ao diagnóstico e a classificação da doença. É importante salientar, porém, que quando existe evidência clínica da hanseníase o resultado da baciloscopia não afasta o diagnóstico de hanseníase. Em alguns lugares do corpo do paciente é mais comum a presença de bacilos da hanseníase, devendo estes, serem eleitos como sítios de coleta. Os sítios de coleta padronizados são: as lesões dermatológicas ou áreas anestésicas, se houver; lóbulos auriculares e cotovelos.

O teste de histamina pode ser utilizado como um apoio ao diagnóstico precoce da hanseníase em casos onde a pesquisa de sensibilidade é difícil ou duvidosa. Este teste é útil para os exames baciloscopia e histopatológico, quando indicados. O teste fornece informações sobre a integridade das ramificações nervosas periféricas.

Quando concluído o processo de diagnóstico o doente deve ser classificado, operacionalmente, para fins de tratamento, em paucibacilar ou multibacilar. A classificação é feita através do exame clínico para a identificação do número de lesões dermatológicas. O doente é classificado como paucibacilar quando apresenta até cinco lesões de pele e o doente com mais de cinco lesões de pele é classificado como multibacilar. A baciloscopia, se disponível, deve ser usada como método para a classificação. O doente que apresenta baciloscopia positiva é classificado como multibacilar e quando a baciloscopia é negativa o paciente é classificado como paucibacilar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O diagnóstico e classificação da hanseníase, em campo, são baseados no exame clínico e na baciloscopia. Testes de diagnóstico como exame histopatológico, inoculação em camundongos, testes sorológicos, testes cutâneos e PCR são limitados a países onde tais técnicas são disponíveis e em centros acadêmicos ou de pesquisa (MOSCHELLA, 2004).

3.2.10 Identificação Molecular de *M. leprae*

A identificação definitiva de *M. leprae* é, algumas vezes, problemática, pois, o organismo não é cultivável. Análises moleculares rápidas foram desenvolvidas para a detecção de *M. leprae* diretamente em amostras clínicas usando dados genéticos disponíveis.

As análises são baseadas, principalmente, na amplificação de seqüências específicas do *M. leprae* usando PCR e identificação do fragmento de DNA do organismo (SCOLLARD *et al.*, 2006). Diferentes alvos são utilizados no desenvolvimento de análise por PCR para a detecção de *M. leprae* em amostras clínicas como, gene que codifica a proteína de 18 KDa, gene que codifica o antígeno de 36 KDa, gene *groE-L*, gene para 16S rRNA, seqüência repetitiva (RLEP), gene *LSR/A15*, região intergênica 85 A-C (*fbpA-fbpC*), região do gene Ag 85 B (*fbpB*) e também, RNA ribossômico.

WOODS e COLE (1989) desenvolveram um método baseado na PCR para detectar *M. leprae* em amostras de biópsia. Dois pares de *primers* foram empregados, um par amplificou o fragmento de 714 pb do gene *groE-L* que codifica o antígeno de 65 KDa e o outro par amplificou um fragmento de 372 pb de uma seqüência repetitiva. Os produtos de PCR foram visualizados por coloração em brometo de etídio após eletroforese em gel e agarose ou por *Southern blotting*. A seqüência repetitiva está presente cerca de 23 vezes no cromossomo, enquanto o gene *groE-L* está presente em cópia única, portanto, o uso da seqüência repetitiva como seqüência-alvo permitiu aumentar a sensibilidade da PCR.

SANTOS (1992) empregou a técnica de PCR baseada na seqüência repetitiva descrita por WOODS e COLE (1989) para detecção de *M. leprae* em diferentes amostras clínicas como, sangue, linfa, biópsia e pêlo de pacientes multibacilares e paucibacilares não tratados. Para eliminar resultados falso-positivos devido a amplificação não específica, o material amplificado foi submetido à hibridização. Estabeleceu-se um limite de detecção visual, com DNA alvo purificado, posteriormente confirmado por hibridização, de 100 ag. Após hibridização dos produtos de PCR com seqüência específica, 25 dos 27 pacientes analisados forneceram resultados positivos para *M. leprae* em ao menos uma das amostras.

YOON *et al.* (1993) avaliaram parâmetros da técnica de PCR, que amplifica um fragmento de 372 pb da sequência repetitiva de *M. leprae*, em biópsias de pacientes com hanseníase antes do tratamento. Os resultados de PCR foram comparados com o índice bacteriológico (IB) de biópsias e de esfregaços de pele. Uma amostra com apenas um único organismo forneceu resultado positivo por PCR. A PCR foi positiva para 11 (73,3%) das 15 biópsias com IB igual a zero determinado a partir de biópsias. A PCR também forneceu resultados positivos para 84 (86,6%) das 87 amostras com IB positivo. Embora não houve diferença estatisticamente significativa entre PCR e microscopia, a PCR parece ter vantagem sobre a microscopia na detecção de *M. leprae* em biópsias negativas para bacilos ácido-resistentes.

JAMIL *et al.* (1994) desenvolveram um método de PCR *nested* de tubo único, usando como alvo a sequência repetitiva (RLEP) para o diagnóstico de pacientes com hanseníase paucibacilar. A detecção dos produtos de PCR foi simplificada utilizando um método colorimétrico. O teste foi específico para *M. leprae* e a sensibilidade foi de 1 fg de DNA genômico purificado de *M. leprae*. Os resultados da PCR utilizando biópsias de pele de pacientes não tratados mostraram que a análise poderia detectar 100% das amostras multibacilares (IB \geq 2), 69% e 70% das amostras com IBs de um e zero, respectivamente. Também se utilizou a técnica para avaliar a efetividade da poliquimioterapia.

CHEMOUILLI *et al.* (1996) descreveram um método para a detecção de *M. leprae* por PCR em biópsias de nervo seccionadas com criostato e tratadas com proteinase K. A sequência-alvo utilizada na PCR foi a sequência repetitiva RLEP, que produziu um fragmento de 447 pb. Todas as amostras examinadas de pacientes com hanseníase lepromatosa foram PCR positiva, enquanto apenas 50% das amostras examinada de nervos, nas quais nenhum bacilo foi visível, produziram resultados positivos.

ALMEIDA *et al.* (2004) investigaram se o DNA de *M. leprae* poderia ser detectado em amostras de sangue e de secreção nasal de contatos domiciliares por PCR usando a sequência repetitiva como alvo. Todas as amostras foram submetidas à hibridização para excluir qualquer resultado falso positivo ou negativo.

Duas amostras de sangue de um total de 119 (1,7%) e 2 amostras de secreção nasal de um total de 120 analisadas (1,7%) apresentaram PCR positiva.

PLIKAYTIS, GELBER e SHINNICK (1990) desenvolveram um método de PCR *nested* baseado na amplificação de um fragmento de 347 pb do gene *groE-L* (também chamado gene do antígeno de 65 KDa) para a detecção de *M. leprae*. Nenhum produto de amplificação foi produzido com DNAs de 19 outras espécies de micobactérias, 19 espécies não micobacterianas, células de camundongo e células humanas. Produtos de amplificação foram observados para "*M. lufu*", *M. simiae* e *M. smegmatis*. Estes produtos foram distinguidos do produto de *M. leprae* pelo tamanho e pelo padrão de restrição. O método poderia amplificar amostras com 3 fg de DNA genômico de *M. leprae* (quantidade de um bacilo). A técnica, também, foi utilizada para a detecção de *M. leprae* em amostras de biópsia e o limite de detecção nestas amostras foi de 20 células.

HARTSKEERL, WIT e KLATSER (1989) desenvolveram uma PCR baseada na amplificação de um fragmento de 530 pb do gene que codifica o antígeno de 36 KDa para a detecção de *M. leprae*. Os *primers* usados foram capazes de detectar especificamente bacilos de *M. leprae* purificados, como também, *M. leprae* em tecido de tatu. O limite de detecção do método foi de aproximadamente um bacilo.

WIT *et al.* (1991) empregaram a PCR baseada na amplificação de um fragmento de 530 pb do gene que codifica o antígeno rico em prolina de *M. leprae* (chamado também de gene que codifica o antígeno de 36 KDa) em amostras de biópsia congelada ou fixadas provenientes de pacientes com hanseníase não tratados. Quando a PCR foi aplicada em amostras congeladas, a amplificação foi positiva em amostras positivas para bacilos ácido-resistentes e em 56% das amostras de pacientes negativos para bacilos ácido-resistentes. Com as biópsias fixadas em formalina neutra, a amplificação foi positiva em 92% das amostras de pacientes positivos para bacilos ácido-resistentes e em 61% das amostras de pacientes negativos para bacilos ácido-resistentes. As biópsias expostas a fixadores contendo formaldeído não tamponado ou cloreto mercúrico não foram adequadas para amplificação por PCR.

WIT *et al.* (1993) aplicaram a PCR baseada na amplificação de um fragmento de 531 pb do gene que codifica o antígeno rico em prolina de *M. leprae*

em amostras de secreção nasal de pacientes com hanseníase tratados e não tratados, contatos ocupacionais e em controles endêmicos e não endêmicos. Produtos de amplificação foram encontrados em 55% dos pacientes não tratados, em 19% dos contatos ocupacionais, em 12% dos controles endêmicos e em nenhuma das amostras de pacientes com hanseníase sob tratamento, como também, nos controles não endêmicos.

RAFI, DONOGHUE e STANFORD (1995) empregaram a PCR baseada na amplificação de um fragmento de 530 pb do gene que codifica o antígeno de 36 KDa para a detecção de *M. leprae* em amostras de escarro e linfa de pacientes aparentemente curados pela monoterapia com dapsona. Os resultados da PCR foram comparados com os da baciloscopia. De 44 amostras de escarro, 2 foram positivas por PCR (4,5%) e de 44 amostras de linfa dos mesmos pacientes, 10 foram positivas por PCR (22,7%). Nenhum resultado positivo foi encontrado por baciloscopia.

TORRES *et al.* (2003) utilizaram a PCR que amplifica um fragmento de 531 pb do gene que codifica o antígeno de 36 KDa para detecção de *M. leprae* em diferentes amostras clínicas de 60 pacientes com hanseníase. Os pacientes foram divididos em três grupos: (1) 20 pacientes multibacilares com IB positivo e em tratamento; (2) 30 pacientes multibacilares com IB negativo com tratamento, de no mínimo dois anos, completo; (3) 10 pacientes paucibacilares com tratamento de seis meses realizado há oito anos. Nos pacientes multibacilares com IB positivo, o exame histopatológico de lesão detectou bacilos ácido-resistentes em 95% dos casos, no esfregaço de linfa de lesão foi detectado bacilos ácido-resistentes em 75% dos casos, em *swab* de lóbulo de orelha foi detectado bacilos ácido-resistentes em 55% dos casos e em *swab* nasal foi detectado bacilos ácido-resistentes em 40% dos casos. A PCR detectou *M. leprae* em 100% das amostras de biópsia, em 80% de *swab* de linfa de lesão, em 65% de *swab* de linfa de lóbulo da orelha e em 100% de *swab* pós-biópsia. No grupo de pacientes multibacilares com IB negativo os exames de esfregaço de linfa de lesão e histopatológico detectaram um caso de recidiva em um paciente que havia completado o tratamento há três anos. Todos os demais pacientes apresentaram resultados negativos para bacilo ácido-resistentes em todos os sítios, enquanto o PCR detectou *M. leprae* em uma amostra de *swab* de linfa de

lesão, em três amostras de biópsia e em seis amostras de *swab* pós-biópsia. No grupo paucibacilar, nenhum bacilo ácido-resistente foi detectado por método convencionais ou por PCR.

PARKASH *et al.* (2004) empregaram a PCR baseada no gene que codifica o antígeno de 36 KDa para a detecção de *M. leprae* em amostras de urina de 16 pacientes hansenianos, 11 com hanseníase lepromatosa e 5 com hanseníase tuberculóide, e de 8 indivíduos saudáveis. O número de amostras positivas por PCR foram 36,4% (4/11) em pacientes com hanseníase lepromatosa e em 40% (2/5) em pacientes com hanseníase tuberculóide. Nenhuma das amostras de indivíduos saudáveis foi positiva. Outro achado foi que 66,6% (4/6) dos pacientes tratados apresentaram PCR positiva, enquanto, 20% (2/10) dos pacientes não tratados apresentaram PCR positiva.

WILLIAMS *et al.* (1990) desenvolveram um método de PCR acoplado a hibridização para a detecção de *M. leprae* obtido de tecido humano e de camundongo. O segmento de DNA alvo para a amplificação foi uma região de 360 pb do genoma de *M. leprae* que codifica aproximadamente 80% do gene para a proteína de 18 KDa. A PCR foi específica para *M. leprae* e o limite de detecção em biópsia de pele humana foi de 100 bacilos.

SUNG *et al.* (1993) utilizaram a PCR baseada na amplificação de um fragmento de 360 pb do gene que codifica uma proteína de 18 KD para detecção de *M. leprae* em biópsias fixadas em formalina e mantidas em parafina de cinco pacientes com hanseníase multibacilar não tratados e de três pacientes com hanseníase paucibacilar não tratados. Os produtos de PCR foram analisados por *Southern Blot*. Todas as oito amostras apresentaram PCR positiva para *M. leprae* e o limite de detecção da análise foi de um bacilo.

SCOLLARD, GILLIS e WILLIAMS (1998) examinaram amostras de biópsia por PCR usando *primers* para amplificar um fragmento de 360 pb para uma proteína de 18 KD de *M. leprae*. Os produtos PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose por coloração em brometo de etídio e foram confirmados por hibridização *slot blot*. A PCR foi positiva para 10 das 20 amostras diagnosticadas como hanseníase por exame histopatológico e em nenhuma de 17 amostras não

diagnosticadas como hanseníase. A especificidade foi de 100% e a sensibilidade variou de 50% a 83%.

DONOGHUE, HOLTON e SPIGELMAN (2001) desenvolveram dois conjuntos de *primers nested* específicos para *M. leprae*. Os *primers* para o gene que codifica para o antígeno de 18 KDa forneceu um produto externo de 136 pb e em produto interno de 110 pb. Os *primers* baseados na seqüência repetitiva RLEP produziram um produto externo de 120 pb e um produto interno de 99 pb. Comparando com os *primers* do gene para o antígeno de 36 KDa, os *primers* externos do gene para o antígeno de 18 KDa foram 100 vezes mais sensíveis e os *primers* externos para RLEP foram 1000 vezes mais sensíveis. Os dois pares de *primers nested* foram usados para amplificar três amostras de linfa de pacientes com hanseníase tratados com IB de zero e três de seis amostras arqueológicas datadas dos séculos X-XI. As amostras arqueológicas foram positivas com *primers* para o gene do antígeno de 18 KDa, como também, com *primers* para o gene de RLEP. As três amostras de linfa apresentaram PCR *nested* positiva para o gene de RLEP, enquanto, apenas uma das amostras de linfa apresentou resultado positivo para o gene do antígeno de 18 KDa.

GUERRERO *et al.* (2002) padronizaram uma técnica de PCR para amplificar um fragmento de 321 pb utilizando *primers* complementares a um segmento do gene *LSR/A15* que codifica uma proteína de 15 KDa. O limite de detecção da técnica foi de 100 fg de DNA (correspondente a 10-100 bacilos). Com a técnica, foi detectado a presença de *M. leprae* em amostras de secreção nasal de 9 (12,8%) dos 70 contatos domiciliares.

PATTYN *et al.* (1992) avaliaram a sensibilidade da PCR usando como alvo um fragmento de 405 pb do DNA que codifica o fragmento espécie-específico da subunidade 16S do RNAr de *M. leprae*. As amostras examinadas foram tecido de camundongo e biópsias de pele humana. A sensibilidade da técnica variou entre 1 e 3×10^4 organismos.

KURABACHEW, WONDIMU e RYON (1998) desenvolveram uma técnica de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando com alvo o 16S RNAr de *M. leprae* para a detecção do organismo em amostras clínicas. Após eletroforese em gel de agarose os produtos de PCR foram visualizados por *Southern blotting*. Um

fragmento de 171 pb foi amplificado quando RNA de *M. leprae* foi utilizado como molde, mas não quando um painel de RNAs de 28 espécies de micobactérias, 7 gêneros relacionados ao gênero *Mycobacterium* e 3 organismos normalmente encontrados entre a flora da pele ou nariz foram testados. Quando a técnica foi aplicada em amostras clínicas, *M. leprae* foi detectado em 82% das biópsias de pele obtidas de pacientes com hanseníase não tratados, enquanto, biópsias de pele de voluntários saudáveis e de pacientes com outras doenças dermatológicas foram negativas. A técnica foi capaz de detectar 10 bacilos em tecido de camundongo infectado e 23 bacilos em tecido humano. A sensibilidade da PCR-RT foi maior que aquela de esfregaços de linfa corados para bacilos ácido-resistentes ou de amostras de biópsia coradas para bacilos ácido-resistentes, uma vez que 53% das biópsias negativas para bacilos ácido-resistentes foram PCR-RT positivas. Desde que o 16S RNAr é rapidamente degradado em células mortas, a análise pode detectar apenas organismos viáveis e pode ser útil para avaliar a resposta a poliquimioterapia.

HAILE e RYON (2004) desenvolveram um ensaio de hibridização em placa de microtitulação colorimétrico para detecção de *M. leprae* em amostras clínicas. Este sistema detecta produtos amplificados por RT-PCR utilizando como alvo uma sequência espécie-específica do 16S RNAr. O limite de detecção da análise variou entre 10 a 100 bacilos isolados de tecido de camundongo ou de biópsia de pele humana. A sensibilidade para o diagnóstico em amostras clínicas foi avaliada para 58 biópsias de pele de pacientes hansenianos não tratados. A análise detectou produtos de PCR-RT de *M. leprae* em 100% das biópsias de pacientes multibacilares e em 80% das biópsias de pacientes paucibacilares. A análise colorimétrica é rápida, mais sensível e simplifica a detecção de produtos PCR-RT comparado com a análise *Southern blot*.

MARTÍNEZ (2005) realizou um estudo comparativo entre a PCR convencional e a tecnologia da PCR em tempo real (SYBR Green e LUX) para a detecção de *M. leprae* em amostras de biópsia de pele e nervo. Dos quatro sistemas padronizados três (PCR convencional, SYBR e LUX) tiveram como alvo a região intergênica 85 A-C (*fbpA-fbpC*) e, um sistema em tempo real (LUX) teve como alvo a região do gene Ag 85 B (*fbpB*). Em 67 biópsias de nervo processadas com Trizol, 34 (59,6%) amostras foram diagnosticadas como forma neural pura (PNL). Os dados

demonstraram que a associação entre a PCR convencional e o sistema LUX 85 B foi capaz de detectar 11 novos casos que foram negativos para todos os outros critérios laboratoriais, o que representou um incremento de 32,3% (11/34) na taxa de detecção. O percentual de positividade para a PCR foi de 76,5% (26/34) entre os indivíduos que tiveram definido o diagnóstico de PNL quando os sistemas (convencional 85 A-C e LUX B) foram conjugados.

3.2.11 Tratamento

O tratamento integral do doente de hanseníase é efetuado através da poliquimioterapia (tratamento PQT) e do acompanhamento do caso, visando diagnosticar e tratar intercorrências (estados reacionais, efeitos colaterais de medicamentos e recidivas) que podem ocorrer durante ou após o tratamento PQT, bem como prevenir e/ou tratar incapacidades e deformidades físicas provocadas pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

3.2.11.1 Tratamento poliquimioterápico

O tratamento quimioterápico de hanseníase consiste na utilização de um conjunto de medicamentos associados, que são: a rifampicina (droga bactericida), a dapsona e a clofazimina (drogas bacteriostáticas), padronizadas pela OMS e recomendado pelo Ministério da Saúde conhecido como poliquimioterapia padrão OMS (PQT/OMS) ou tratamento PQT.

Nos casos paucibacilares é utilizada a associação de dois medicamentos (rifampicina e dapsona) e nos casos multibacilares é utilizada a associação dos três medicamentos (rifampicina, dapsona e clofazimina). Para os pacientes com contra-indicação formal ou intolerância a algum medicamento desses esquemas são adotados esquemas alternativos. Os medicamentos que podem ser utilizados, além daqueles do esquema-padrão, são ofloxacina e minociclina.

O tratamento PQT previne a evolução da doença, bem como as incapacidades físicas e as deformidades provocadas pela hanseníase; logo no início do tratamento a transmissão da doença é interrompida, pois os medicamentos

destróem o bacilo, que se torna inviable para infectar outras pessoas. O tratamento completo, com a administração correta dos medicamentos, garante a cura da doença.

O tratamento é ambulatorial e deve ser realizado nas unidades básicas de saúde, da rede de serviços do Sistema Único de Saúde.

O paciente deverá ter uma consulta mensal (de 28 em 28 dias) na unidade de saúde para o acompanhamento do seu caso e para receber os medicamentos do tratamento PQT: a dose supervisionada que lhe será administrada durante a consulta e os medicamentos daquele mês que ele deverá tomar em casa, diariamente (doses diárias auto-administradas pelo paciente).

A duração dos esquemas de tratamento PQT deve obedecer aos prazos estabelecidos: de seis a nove meses para os casos paucibacilares e de 12 a 18 meses para os casos multibacilares. Em alguns casos multibacilares poderão necessitar de 12 doses adicionais de PQT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

3.2.11.2 Acompanhamento do caso

Durante o tratamento deve ser feito o acompanhamento do caso, visando o controle do tratamento PQT, o atendimento às possíveis intercorrências que podem acontecer durante, em alguns casos, após o tratamento PQT e a prevenção e o tratamento de incapacidades e deformidades físicas.

Quando o paciente necessitar de atenção de maior complexidade, não existente na unidade de saúde, deve ser encaminhado a unidades de referência. A internação do paciente somente é indicada no caso de intercorrências graves, assim como efeitos colaterais graves dos medicamentos, estados reacionais graves, ou a necessidade de correção cirúrgica de deformidades físicas. Quando necessário, a internação deve ser feita em hospitais gerais e, após a alta hospitalar, o paciente deve ser reencaminhado à sua unidade de origem para dar continuidade ao seu tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Para o tratamento da reação tipo 1 são tipicamente empregados antiinflamatórios corticosteróides. Na reação tipo 2 podem ser utilizados clofazimina, talidomida e pentoxifilina (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Alguns pacientes após a alta podem apresentar intercorrências como reações hansênicas e recidivas. O paciente em estado reacional deve, somente, receber o tratamento para a reação e o paciente com recidiva deve reiniciar o tratamento PQT de acordo com a classificação do paciente em paucibacilar ou multibacilar.

É considerado um caso de recidiva, o paciente, que após ter recebido alta do tratamento PQT da hanseníase, desenvolve novos sinais e sintomas da doença, afastada a possibilidade de estados reacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A frequência de recidiva relatada varia muito, dependendo de vários fatores operacionais e da duração do acompanhamento. Devido ao crescimento lento de *M. leprae*, o acompanhamento de ao menos dez anos é necessário para obter uma avaliação razoável da recidiva. Além desta dificuldade, o fato de que durante os últimos 20 anos de recomendações a cerca da duração do tratamento e combinações de drogas terem se alterado várias vezes, dificulta mais a avaliação (SCOLLARD *et al.*, 2006).

DASANANJALI (1996) avaliou a recidiva na hanseníase após poliquimioterapia entre pacientes tratados de 1984 a 1994. Vinte pacientes paucibacilares e 24 pacientes multibacilares recidivaram entre 5298 pacientes originalmente classificados como paucibacilares e pacientes multibacilares ocorreram em 2624 pacientes originalmente classificados como multibacilares. O intervalo de tempo para a recidiva médio foi de 3-4 anos. A taxa de recidiva entre dez anos após suspensão do tratamento foi de 0,83% em paucibacilares e 0,19% em multibacilares. A taxa de recidiva estimada por 1000 pessoa/anos foi de 1,55 para paucibacilares e 0,41 para multibacilares.

DASANANJALI, SCHEUDER e PIRAVAVARAPORN (1997) examinaram 188 pacientes de hanseníase (130 paucibacilares e 58 multibacilares) de abril de 1984 a março de 1985. O estudo continuou até maio de 1996. Os resultados mostraram que 182 pacientes completaram o tratamento; 167 pacientes (122 PB e 45 MB) foram liberados do acompanhamento; 82 pacientes paucibacilares foram disponíveis para acompanhamento até o final de 1994 e 31 pacientes paucibacilares até maio de 1996. Dois pacientes paucibacilares foram diagnosticados com recidiva,

mostrando uma taxa de recidiva de 0,2 por 100 pessoa/anos em risco. Após uma média de oito anos de acompanhamento, nenhum multibacilar recidivou.

LI *et al.*, (1997) avaliaram 8307 pacientes de hanseníase após tratamento entre 1986 e 1995. A taxa de recidiva média para pacientes multibacilares foi de 0,15/1000 pessoa/anos e para pacientes paucibacilares 0,55/1000 pessoa/anos. Nos pacientes multibacilares, as cinco recidivas ocorreram entre quatro a sete anos e em pacientes paucibacilares, cinco recidivas ocorreram entre quatro a cinco anos após o tratamento.

CHEN *et al.*, (1999) avaliaram 47276 pacientes curados ou liberados da poliquimioterapia em um período de seis anos. A taxa de recidiva total foi de 0,73/1000 paciente/anos. Houve uma diferença significativa estatisticamente nas taxas de recidiva de pacientes multibacilares (0,61/1000 paciente/anos) e paucibacilares (1,04/1000 paciente/anos).

HALDAR *et al.*, (2003) relataram uma taxa de recidiva de 1,71/1000 pessoa/anos para pacientes paucibacilares originais e 0,76/1000 pessoa/anos para pacientes multibacilares originais. Os pacientes foram acompanhados após o tratamento por um período de dois anos para paucibacilares e cinco anos para multibacilares. O estudo também mostrou que a história de contato com pacientes de hanseníase ativos e tratamento irregular conduziu mais pacientes paucibacilares a recidiva que os pacientes controles.

NORMAN, JOSEPH e RICHARD (2004) relataram um estudo em que 173 pacientes multibacilares foram acompanhados por 20 anos após terem iniciado o tratamento. A duração média de acompanhamento foi de $16,4 \pm 1,83$ anos. Dois pacientes recidivaram 14 a 15 anos depois de terem completado o tratamento, sendo taxa de recidiva de 0,07 por 100 pessoa/anos de acompanhamento.

GELBER, BALAGON e CELLONA (2004) relataram que a recidiva está confinada aos pacientes com BL e LL com alto índice bacteriológico e ocorre muito tempo depois do término do tratamento.

ALI *et al.*, (2005) realizaram um estudo que incluiu 3248 pacientes (2892 PB e 356 MB). Um total de 58 casos de recidiva foram relatados, o que forneceu uma taxa acumulativa bruta de recidiva de 1,78% para o período de 16 anos de acompanhamento; as taxas para PB e MB foram de 1,9% e 0,84%, respectivamente.

Com respeito aos paucibacilares, 68% das recidivas foram relatadas nos primeiros três anos após o tratamento. O número de lesões de pele e envolvimento de nervos foram os principais fatores de risco para a recidiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BIOSSEGURANÇA

No presente trabalho os procedimentos realizados para manipular os microrganismos seguiram recomendações estabelecidas por VESLEY e LAUER (1995), U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* (1995), KEUHNE *et al.* (1995), GILCHRIST (1995), FLEMING (1995) e OMS (2003), assim com as recomendações determinadas pelas Boas Práticas de Laboratório. Para descontaminação de vidraria, materiais e bancadas foram empregados germicidas selecionados conforme BEST *et al.* (1990), COLE *et al.* (1990), RUTALA *et al.* (1991) e RUSSELL (1996).

4.3 MICRORGANISMOS

4.2.1 Cepas Referência

As cepas referência (tabela 12) foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com exceção de *M. bovis*, que foi adquirida da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz.

TABELA 12 – CEPAS REFERÊNCIA E RESPECTIVOS CÓDIGOS

ESPÉCIE	CÓDIGO
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478
<i>M. avium</i>	ATCC 25291
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC 6841
<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755
<i>M. phlei</i>	ATCC 11758
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 607
<i>M. bovis</i>	BCG-MORAEU

Para *M. leprae* referência foi trabalhado apenas com DNA, que foi gentilmente cedido por Dr. David Scollard, do Laboratory Research Branch, National

Hansen's Disease Programs, Louisiana State University-SVM, Baton Rouge, Louisiana 70803, EUA. Também foi obtido DNA de uma cepa de paciente com hanseníase virchowiana gentilmente cedida por Dr. Milton Osório Moraes, do Laboratório de Hanseníase, Departamento de Medicina Tropical da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A cepa de *M. tuberculosis* foi obtida junto ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) e identificada por MALAGHINI *et al.* (comunicação pessoal).

4.2.2 Amostras Clínicas

Para pesquisa das micobactérias, em esfregaço ou por reação em cadeia da polimerase (PCR), foram coletados 23 hansenomas, uma amostra de fígado de tatu infectado por *M. leprae*, e uma cultura de micobactéria obtida de paciente hanseniano virchowiano.

Os hansenomas foram colhidos de pacientes com diagnóstico confirmado anteriormente. A coleta foi feita no serviço médico de diferentes regiões do estado do Paraná e do país e encaminhada ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Ao chegar à instituição o material foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e após o resfriamento foi congelado em *freezer* a -20°C até seu uso.

No total foram obtidas 23 biópsias de humanos com hanseníase virchowiana, sendo 20 procedentes de 7 municípios do Estado do Paraná, 2 de São Paulo e 1 de Minas Gerais. Onze pacientes estavam em tratamento por período de 4 dias a 24 meses. A tabela 13 contém informações referentes aos pacientes submetidos à biópsia, dados de origem, forma clínica, uso de medicamentos, período de tratamento até a coleta do hansenoma e alta médica.

A amostra de fígado de tatu infectado com *M. leprae* foi cedida gentilmente por Dr^a. Maria Esther Salles Nogueira e Dr^a. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

A micobactéria isolada era procedente de lesão de paciente hanseniano virchowiano diagnosticado na Fundação Pró-Hansen, que estava mantida em meio de Löwenstein-Jensen e em meio líquido constituído por caldo extrato de carne acrescido de plasma humano na proporção de 2:1 (MIRANDA *et al.*, 1989).

TABELA 13 – INFORMAÇÕES REFERENTES AOS PACIENTES SUBMETIDOS À BIÓPSIA

PACIENTE	ORIGEM	FORMA CLÍNICA	TRATAMENTO	PERÍODO DE TRATAMENTO	ALTA
CPPI 1	Curitiba/PR	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 2	Guarapuava/PR	V	Sim	4 meses (clofazimina)	Alta
CPPI 3	Guarapuava/PR	V	Sim	5 meses (clofazimina)	Alta
CPPI 4	Guarapuava/PR	V	Não	N.A.	Alta
CPPI 5	Curitiba/PR	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 6	Jacarezinho/PR	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 7	Foz do Iguaçu/PR	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 8	Cascavel/PR	V	Sim	4 dias (PQT/MB)	N.A.
CPPI 9	Cascavel/PR	V	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.
CPPI 10	Foz do Iguaçu/PR	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 11	Guarapuava/PR	V	Não	N.A.	Alta
CPPI 12	Curitiba/PR	V	Sim	9 meses (PQT/MB)	N.A.
CPPI 13	Curitiba/PR	V	Sim	4 meses (PQT/MB)	N.A.
CPPI 14	Piraquara/PR	V	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.
CPPI 15	Curitiba	V	Sim	2 meses (PQT/MB)	N.A.
CPPI 16	Curitiba	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 17	Piraquara	V	Sim	24 meses (Esquema alternativo há 3 meses)	N.A.
CPPI 18	Ribeirão Preto/SP	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 19	Piraquara/PR	V	Sim	⁽¹⁾ 11 meses	N.A.
CPPI 20	Uberlândia/MG	V	Não	N.A.	N.A.
CPPI 21	Maringá	V	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.
CPPI 22	Guarapuava/PR	V	Não	N.A.	Alta
CPPI 23	Bauru/SP	V	Não	N.A.	N.A.

NOTAS: V = hanseníase virchowiana.

N.A. = não aplicável.

PQT/MB = poliquimioterapia esquema multibacilar.

(1) Paciente teve diagnóstico de hanseníase indeterminada com baciloscopia negativa, tratou por seis meses com PQT/PB (poliquimioterapia esquema paucibacilar). Dois meses depois, teve diagnóstico de hanseníase virchowiana, com baciloscopia positiva e recebeu PQT/MB. O período de tratamento até a coleta foi de cinco meses.

4.3 CULTIVO DE MICRORGANISMOS

Após o recebimento das cepas referências, as mesmas foram hidratadas com solução de glicerol 10% e a suspensão obtida foi usada para semear quatro

tubos de meio Löwenstein-Jensen. Para *M. smegmatis* usou-se quatro tubos de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e quatro tubos de caldo BHI. Todas as cepas foram criopreservadas e armazenadas a -70°C (anexo 1).

Para o cultivo, os tubos semeados foram incubados em estufa a 37°C até o desenvolvimento de colônias. Após crescimento, os tubos com os microrganismos foram armazenados em refrigerador a 4°C. A cada seis meses, as culturas foram repicadas.

4.4 RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA BACTERIANA

As células micobacterianas, em meio Löwenstein-Jensen, foram removidas por raspagem da superfície do meio em solução de cloreto de sódio a 0,9%. A suspensão de células obtida foi recolhida em tubo de centrífuga de 15 ml. As células que se desenvolveram em meio líquido, tiveram o conteúdo dos tubos de cultivo transferidos para tubos de centrífuga de 50 ml. A suspensão de células contida em tubos foi inativada pelo calor e, em seguida, submetida à centrifugação a 2.500 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em solução tampão de Tris-EDTA (TE). Novamente, a suspensão de células foi centrifugada a 2.500 g por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento transferido para microtubos de 2 ml e armazenados a -20°C até sua utilização para a extração do DNA (ver item 4.6.1). O procedimento de recuperação da biomassa está descrito no anexo 2.

4.5 PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS PARA REMOÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

Os fragmentos de hansenoma foram processados da seguinte forma:

1. Cortar com bisturi um fragmento e transferir o mesmo para gral;
2. Adicionar 10 ml de solução tampão (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM e EDTA 10 mM, pH 7,4) em tubos cônicos previamente identificados;
3. Adicionar, com auxílio de pipeta pasteur, 1 ml de tampão no gral para triturar o fragmento de tecido;
4. Triturar o material com auxílio de pistilo;

5. Transferir o macerado para o tubo de células;
6. Adicionar, com o auxílio de pipeta pasteur, 2 ml de solução tampão no gral e transferir o conteúdo para o tubo de células. O processo deverá ser repetido até que todo resíduo de tecido seja removido do gral;
7. Homogeneizar os tubos com células em agitador tipo vortex;
8. Centrifugar os tubos contendo as células a 300 g por 1 minuto;
9. Transferir o sobrenadante, com auxílio de pipeta pasteur, para o respectivo tubo identificado com o número da amostra e sobrenadante (tubo de 100 ml);
10. Ao tubo com o sedimento, adicionar, 10 ml de solução tampão;
11. Homogeneizar os tubos com células em agitador tipo vortex;
12. Centrifugar os tubos nas mesmas condições do item 8;
13. Em seguida, transferir o sobrenadante, com auxílio de pipeta pasteur, para o mesmo tubo destinado para a coleta do sobrenadante;
14. Repetir os passos 10 ao 13 por mais uma vez;
15. Centrifugar os tubos contendo o sobrenadante a 2.500 g por 15 minutos;
16. Descartar o sobrenadante para recipiente de coleta;
17. Transferir, com auxílio de pipeta pasteur, o sedimento obtido do sobrenadante para tubo cônico de 15 ml identificado para tal;
18. Com auxílio da mesma pipeta pasteur usada no item 17, remover resíduos do sedimento no tubo através de lavagens do mesmo com solução tampão e transferir o lavado para o tubo cônico de 15 ml (sobrenadante);
19. Centrifugar os tubos contendo o sedimento do sobrenadante em 2.500 g por 15 minutos;
20. Durante a centrifugação, preparar lâmina, para pesquisa de bacilos ácido-resistentes (ver anexo 3) do sedimento resultante do item 14 e distribuir o mesmo, cerca de 100 a 200 μ l, com auxílio de micropipeta e ponteira com extremidade cortada, para microtubos identificados com amostra e com sedimento;
21. Após a centrifugação, transferir, com auxílio de pipeta pasteur, o sobrenadante para o mesmo recipiente de coleta do sobrenadante (descarte);
22. Preparar uma lâmina, para pesquisa de bacilos ácido-resistentes, no sedimento obtido do sobrenadante;

23. Distribuir, cerca de 100 a 200 μ l, com auxílio de micropipeta e ponteira com extremidade cortada, o sedimento do sobrenadante para microtubos identificados com amostra e com sobrenadante;

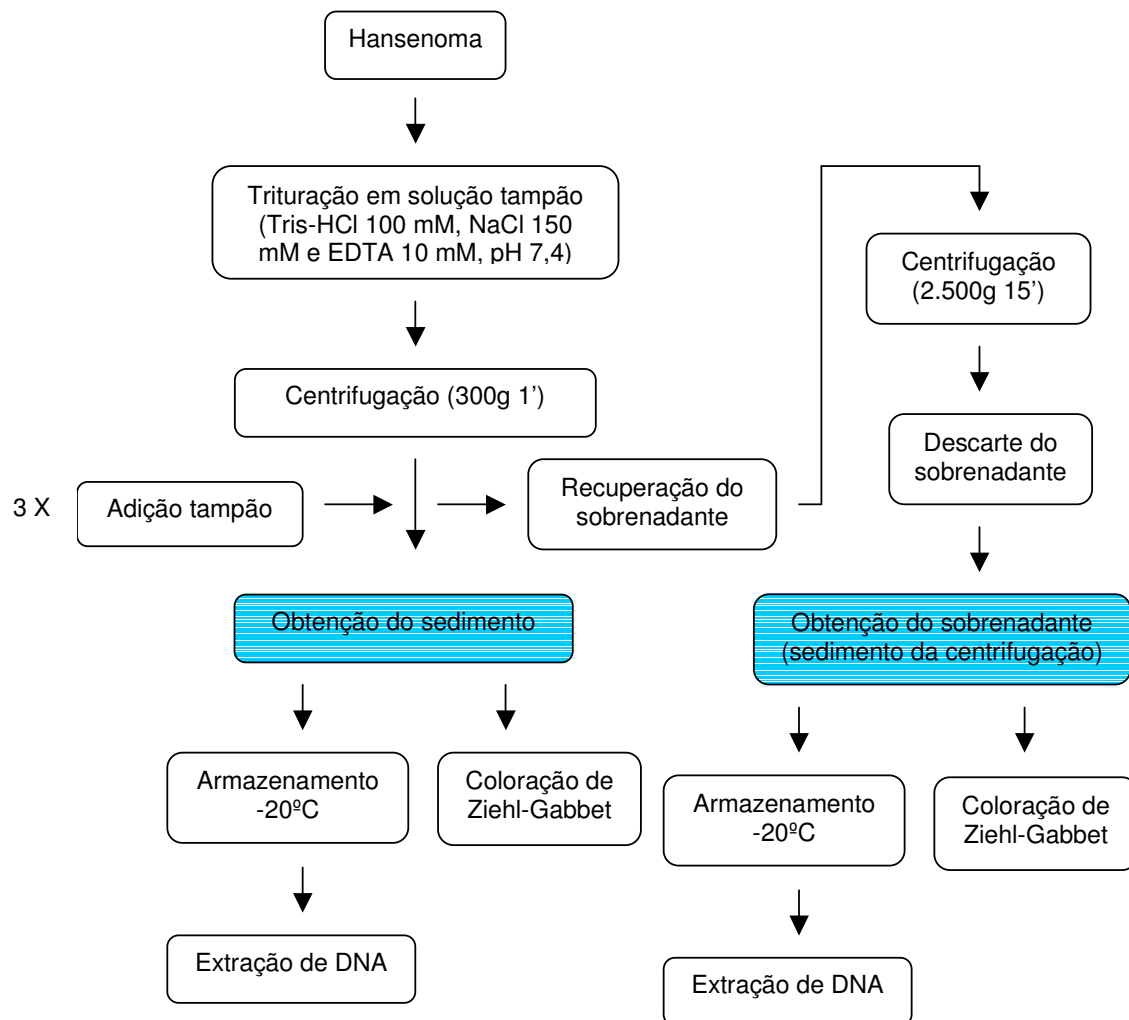
24. Submeter um microtubo com sedimento e um microtubo com sobrenadante ao choque térmico (5 minutos a 95°C e -70°C até congelar por três vezes consecutivas);

25. Adicionar aos microtubos solução tampão para um volume final de 400 μ l;

26. Armazenar os microtubos a -20°C para posterior extração de DNA.

A figura 7 mostra um fluxograma que esquematiza o procedimento de processamento das biópsias.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS



4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE MICOBACTÉRIAS DE BIÓPSIAS E CULTURAS

4.6.1 Extração de DNA das Culturas de Micobactérias

O propósito da extração de DNA é separar o DNA de todos os componentes da célula, como por exemplo, aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas, resultando em uma solução que representa toda a informação genética contida dentro da célula. Não há dificuldade em separar o DNA de moléculas pequenas visto que o peso molecular do DNA é elevado. Conseqüentemente, os principais componentes celulares que devem ser removidos durante a purificação do DNA são proteínas e RNA (SURZYCKI, 2000).

Os métodos de extração de DNA envolvem quatro passos:

- Lise celular;
- Remoção de proteínas e RNA;
- Concentração de DNA;
- Determinação da pureza e concentração de DNA.

Em vista das características da parede celular das micobactérias, foram avaliados dois protocolos para a extração de DNA, um segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989) e outro segundo BELISLE e SONNENBERG (1998). Estes protocolos serão aqui denominados: protocolo um e dois, respectivamente. Para testá-los foram usadas duas amostras de células obtidas de micobactérias cultiváveis. O detalhamento dos protocolos está descrito no anexo 4.

No protocolo um, o rompimento celular se deu pela ação do detergente aniônico SDS (dodecil sulfato de sódio), enquanto, no protocolo dois, a lise celular ocorreu pela ação da lisozima e posteriormente pela ação do SDS.

No protocolo dois, antes do tratamento com lisozima, as células micobacterianas foram colocadas em contato com uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de dois para um. A solução possui a função de remover os lipídios da parede celular expondo o peptidoglicano e assim deixando a célula mais sensível a clivagem pela lisozima. Segundo BELISLE e SONNENBERG (1998), esta extração também inativa o bacilo. A suspensão celular, depois de ter seu pH ajustado, recebeu a lisozima. Após o período de incubação, as soluções de SDS e

proteínase K foram adicionadas. O SDS atua como auxiliar na lise celular e na remoção de proteínas. A proteinase K, requerida para aumentar a eficiência da remoção de proteínas por solventes orgânicos, foi utilizada numa concentração reduzida pela metade em relação ao protocolo um. O tempo de ação do SDS e proteinase K no protocolo um foi de quatro horas e duas horas, respectivamente e no protocolo dois foi para ambos de três horas.

Após digestão, pela proteinase K, solventes orgânicos foram utilizados para a remoção de proteínas. Os métodos de desproteinização que usam solventes orgânicos foram associados para permitir eficiente remoção de proteínas. No protocolo um, usou-se a extração com fenol saturado e com a mistura fenol/clorofórmio/álcoolisoamílico (25:24:1). A extração subsequente com clorofórmio visava a remoção de traços de fenol da solução de ácidos nucleicos. No protocolo dois, combinou-se a extração de proteínas com a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e com a mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A extração, com a última mistura, possui também a função de remover fenol residual. Os tempos de centrifugação usados no protocolo um, durante a remoção de proteínas, foram de 5 minutos, enquanto no protocolo dois os tempos foram de 30 minutos, para a mesma velocidade de rotação. Observou-se que com 30 minutos a camada protéica formada na interface orgânica-aquosa era mais compactada o que facilitou a coleta da fase aquosa. O tempo de homogeneização entre a fase orgânica formada pela mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a fase aquosa no protocolo um foi de 10 minutos e no protocolo dois foi de 30 minutos. Tempo maior de homogeneização sugere melhor eficiência na remoção de proteínas da solução de DNA, mas, também mais danos podem ser introduzidos na estrutura do DNA.

Apenas no protocolo um usou-se RNase para remoção de RNA.

Após a remoção de proteínas e RNA ou apenas proteínas, realizou-se a precipitação do DNA com etanol na presença de acetato de sódio 3M. No protocolo um, a precipitação ocorreu a -20°C por no mínimo quatro horas, enquanto, no protocolo dois, ocorreu a 4°C por uma hora.

Após precipitação do DNA, o mesmo foi lavado com etanol 70%. No protocolo um, por duas vezes e no protocolo dois, por uma vez. O etanol 70% é usado para eliminar solutos inorgânicos e moléculas orgânicas pequenas. Em

seguida o pélete de DNA foi seco a 37°C por 10 minutos e depois dissolvido em água ultrapura.

4.6.2 Extração de DNA das Amostras Clínicas

Para cada amostra usou-se o sedimento e o sobrenadante para extração de DNA. O detalhamento do protocolo de extração está descrito no anexo 5.

A biópsia foi triturada em gral e os bacilos liberados foram separados do material restante, que ainda contém bacilos.

A solução tampão usada, além de Tris e EDTA, que por sua vez estão em maior concentração que na solução tampão de TE, continha NaCl.

O rompimento das células (tecido e microrganismo) ocorreu por três ciclos de congelamento a -70°C por cinco minutos e descongelamento a 95°C por cinco minutos. Neste processo, há formação intracelular de grandes cristais de gelo que podem perfurar a célula e provocar sua lise. O aquecimento da suspensão celular também resultou no rompimento das células, como a incubação do material a 60°C por 12 horas.

A remoção de proteínas ocorreu pela ação da proteinase K e por métodos que utilizam solventes orgânicos. Usou-se além da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), fenol saturado.

Para a precipitação do DNA foi usado etanol absoluto. A precipitação foi realizada a -20°C e a centrifugações a 4°C. Após lavagem de pélete com álcool 70% por duas vezes, o DNA foi seco em estufa a 37°C por 10 minutos e posteriormente dissolvido em água ultrapura.

4.6.3 Quantificação e Determinação da Pureza do DNA Genômico

A determinação da concentração e pureza do DNA foi realizada em GeneQuant II (Pharmacia Biotech). O detalhamento do procedimento de quantificação do material genético está descrito no anexo 6. Para as amostras provenientes de cultura, preparou-se a partir das concentrações obtidas uma solução de DNA de trabalho de 20 ng/μl.

Das amostras provenientes de tecido não foi dosado os DNA(s), pois, a distinção entre o DNA do microrganismo e do hospedeiro não é possível.

4.6.4 Eletroforese

No presente trabalho, realizou-se a eletroforese em gel de agarose para DNA genômico e dos produtos de PCR. A concentração de agarose utilizada para o DNA genômico e produtos de PCR foram de 0,8% e 1,6%, respectivamente. O tampão de eletroforese empregado foi TAE (Tris-Acetato-EDTA). A voltagem aplicada foi de 60 V, para uma cuba com 18,0 cm de distância entre os eletrodos. O tampão de amostra utilizado era composto por 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose em água. O procedimento de eletroforese em gel de agarose está descrito no anexo 7.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR): SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS-ALVO E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Frente às várias seqüências-alvo existentes foram selecionadas duas, a saber, o fragmento de 439 pares de bases do gene que codifica uma proteína de choque térmico de 65 KDa (*hsp65*) e o fragmento de 342 pares de bases (pb) do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*).

As reações de amplificação foram realizadas em 60 μ l de volume final (ver itens 4.7.1 e 4.7.2).

A quantidade de DNA a ser usada na reação foi diferente se o material era procedente de cultivo ou de biópsia de tecido. Para as amostras provenientes de cultura, utilizou-se 5 μ l e 7,5 μ l da solução de DNA a 20 ng/ μ l para a amplificação do fragmento do gene *hsp65* e do fragmento do gene *rpoB*, respectivamente.

Para as amostras provenientes de tecidos utilizou-se de 1,5 μ l a 30 μ l da solução de DNA para um volume de reação de 60 μ l. Inicialmente, realizou-se uma PCR com menores quantidades de solução de DNA, se não houvesse amplificação o produto desta PCR foi usado para uma segunda PCR. Quando não se observava

o produto da reação, fez-se uma nova PCR com maiores quantidades de solução de DNA e se não ocorresse a amplificação, o produto desta PCR foi usado para uma segunda PCR.

A fração de escolha para a amplificação do DNA de micobactérias para cada amostra de tecido foi o material extraído do sobrenadante, mas quando não houve amplificação com esta fração, foi usado o sedimento correspondente da amostra.

Quando todas as condições foram testadas e não havendo amplificação do fragmento de DNA esperado, empregou-se o procedimento *touchdown* PCR.

O *touchdown* PCR foi empregado em combinação com *hot start*. Para isto, realizaram-se os seguintes passos: preparar a mistura de PCR com todos os componentes, exceto a *Taq* DNA polimerase; cobrir o conteúdo de cada tubo de reação com 30 µl de óleo mineral; incubar os tubos em um termociclador a 94°C por 2 minutos; manter a reação a 94°C e adicionar *Taq* DNA polimerase em cada um dos tubos, certificando-se de adicionar a enzima abaixo da camada de óleo; continuar com os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

4.7.1 Amplificação do Fragmento do Gene *hsp65*

O protocolo usado foi proposto por TELENTI *et al.* (1993). A reação de PCR realizada para 60 µl possui a seguinte composição: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 30 pmoles de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 10% glicerol e 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (ver tabela 14).

Os *primers* (iniciadores) utilizados foram:

- Tb11 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'
- Tb12 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'

A condição de amplificação utilizada para a reação de PCR está descrita na tabela 15 e para *touchdown* PCR, na tabela 16.

TABELA 14 – VOLUME E CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES USADOS PARA PREPARAR 60 µl DA MISTURA DE PCR DO GENE *hsp65*

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	VOLUME PARA UM TUBO DE 60 µL
Água ultra pura	-	⁽¹⁾ q.s.p. 60 µl
Glicerol	-	6,0 µl
Tampão	10X	6,0 µl
MgCl ₂	50 mM	1,8 µl
dNTPS	2,5 mM	4,8 µl
Primer Tb11	20 pmol/µl	1,5 µl
Primer Tb12	20 pmol/µl	1,5 µl
Taq DNA polimerase	5U/µl	0,3 µl

(1) q.s.p. = quantidade suficiente para.

TABELA 15 – PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO SEM *TOUCHDOWN* DO GENE *hsp65*

PASSO	TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	Nº CICLOS
1	5	94	1
2	1	94	45
	1	60	
	1	72	
3	10	72	1

TABELA 16 – PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO COM *TOUCHDOWN* DO GENE *hsp65*

PASSO	TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	Nº CICLOS
1	5	94	1
2	1	94	2
	1	65	
	1	72	
3	1	94	10
	1	(a cada ciclo diminuição de 1°C) 65	
	1	72	
4	1	94	33
	1	55	
	1	72	
5	10	72	1

4.7.2 Amplificação do Fragmento do Gene *rpoB*

O protocolo para amplificar o gene *rpoB* foi proposto por KIM *et al.* (2001). A reação de PCR realizada para 60 µl possui a seguinte composição: 50 mM KCl, 20

mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 60 pmoles de cada *primer*, 3 U de *Taq* DNA polimerase e 250 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (ver tabelas 17).

Os iniciadores utilizados foram:

- MF 5' CGACCACTTCGGCAACCG 3'
- MR 5' TCGATCGGGCACATCCGG 3'

A condição de amplificação utilizada para a reação de PCR está descrita na tabela 18 e para *touchdown* PCR, na tabela 19.

TABELA 17 – VOLUME E CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES USADOS PARA PREPARAR 60 µl DA MISTURA DE PCR DO GENE *rpoB*

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	VOLUME PARA 1 TUBO DE 60 µL
Água ultra pura	-	⁽¹⁾ q.s.p. 60 µl
Tampão	10X	6,0 µl
MgCl ₂	50 mM	1,8 µl
dNTPS	2,5 mM	6,0 µl
<i>Primer</i> MF	20 pmol/µl	3,0 µl
<i>Primer</i> MR	20 pmol/µl	3,0 µl
<i>Taq</i> DNA polimerase	5U/µl	0,6 µl

(1) q.s.p. = quantidade suficiente para.

TABELA 18 – PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO SEM *TOUCHDOWN* DO GENE *rpoB*

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA (°C)	Nº CICLOS
1	5 min	94	1
2	30 s	95	30
	30 s	60	
	45 s	72	
3	5 min	72	1

TABELA 19 – PROGRAMAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO COM *TOUCHDOWN* DO GENE *rpoB*

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA (°C)	Nº CICLOS
1	5 min	94	1
2	30 s	95	2
	30 s	63	
	45 s	72	
3	30 s	95	8
	30 s	(a cada ciclo diminuição de 1°C) 63	
	45 s	72	
4	30 s	95	20
	30 s	55	
	45 s	72	
5	5 min	72	1

4.8 POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III e *Bst* EII para o fragmento do gene *hsp65* e com as enzimas *Hae* III e *Bst* UI para o fragmento do gene *rpoB*. Os componentes para uma reação de 15 µl estão dispostos na tabela 20. A digestão foi realizada em estufa na temperatura indicada pelo fabricante por 12 a 24 horas.

TABELA 20 – VOLUMES DOS REAGENTES USADOS PARA PREPARAR A MISTURA DE DIGESTÃO

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	VOLUME PARA UMA REAÇÃO DE 15 µL
Água ultrapura	-	3,0 µl
Tampão	10X	1,5 µl
Enzima de restrição	10 U/µl	0,5 µl
Produto da PCR	-	10,0 µl

A enzima *Hae* III é isolada de *Haemophilus aegyptius*, enquanto as enzimas *Bst* EII e *Bst* UI são isoladas do *Bacillus stearothermophilus*. Os sítios de reconhecimento estão descritos na tabela 21.

TABELA 21 – SEQÜÊNCIAS DE RECONHECIMENTO PARA AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Hae* III, *Bst* EII E *Bst* UI

ENZIMA DE RESTRIÇÃO	SEQÜÊNCIA DE RECONHECIMENTO
<i>Hae</i> III	5'-G G↓ C C-3' 3'-C C↑ G G-5'
<i>Bst</i> EII	5'-G↓G T N A C C-3' 3'-C C A N T G↑G-5'
<i>Bst</i> UI	5'-C G↓ C G-3' 3'-G C↑ G C-5'

NOTAS: As setas indicam sítios de clivagem.
N indica qualquer base.

Após o período de digestão, o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração do gel empregada para o fragmento do gene *hsp65* foi de 10% e para o fragmento do gene *rpoB* foi de 8%. O tampão de eletroforese utilizado foi TBE (Tris-Borato-EDTA). O tampão de amostra era composto de 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose em água sacarose. A corrida eletroforética foi realizada em 60 V. O procedimento de digestão e eletroforese estão descritos no anexo 8 e 9 respectivamente. As amostras que apresentaram arraste em eletroforese em gel de poliacrilamida tiveram o produto de PCR purificado usando o *kit* PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen) e submetidas novamente ao RFLP.

4.9 ANÁLISE DE DADOS

Para avaliar o peso molecular dos fragmentos gerados por RFLP foi usado o programa *Gelpro Analyser*. Os fragmentos de restrição menores que 50 pb não foram considerados.

5 RESULTADOS

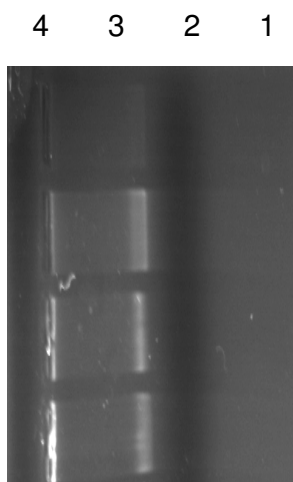
5.1 EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Os dois protocolos usados para extração do DNA foram analisados quanto a sua eficiência, em espectrofotometria para avaliar a pureza e concentração do DNA, e em eletroforese em gel de agarose, para avaliar a qualidade do DNA (tabela 22 e figura 8). A relação A_{260}/A_{280} variou de 1,431 a 1,679.

TABELA 22 – PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA EM $\mu\text{g/ml}$ DETERMINADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA REFERENTES AS CEPAS *M. kansasii* E *M. phlei*

AMOSTRA	PROTOCOLO	A_{260}/A_{280}	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)
<i>M. kansasii</i>	1	1,591	27,2
<i>M. phlei</i>	1	1,670	38,4
<i>M. kansasii</i>	2	1,431	43,5
<i>M. phlei</i>	2	1,679	71,1

FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8% DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS CEPAS *M. kansasii* E *M. phlei*



As linhas 1 e 2 referem-se ao DNA obtido das cepas *M. kansasii* e *M. phlei*, respectivamente, segundo o protocolo 1. As linhas 3 e 4 referem-se ao DNA obtido das cepas *M. kansasii* e *M. phlei*, respectivamente, segundo o protocolo 2.

Quando se avaliou a concentração do DNA, verificou-se que maiores concentrações foram obtidas com o protocolo dois. Porém, quanto à pureza do DNA, verificou-se que o protocolo um foi mais eficiente.

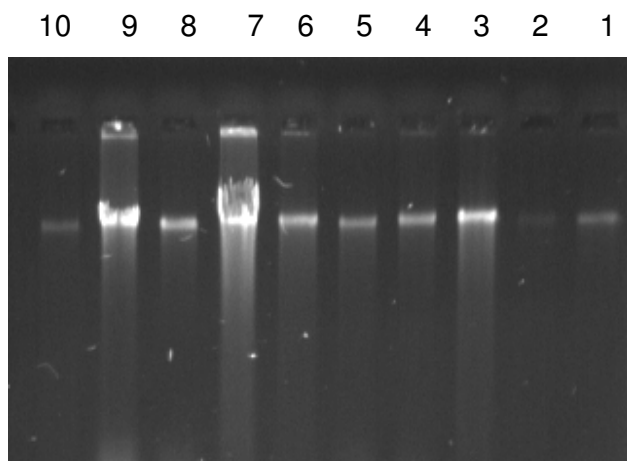
A escolha de um protocolo de extração de DNA é baseada na quantidade de DNA e na pureza, necessárias para o propósito que se deseja. A reação de PCR requer pequenas quantidades de DNA, cerca de 50 a 500 ng, e pode tolerar a presença de proteínas contaminantes (SURZYCKI, 2000). Portanto, ambos os protocolos atenderam as necessidades para a reação de PCR. Porém, ao avaliar as duas variáveis optou-se por trabalhar com o protocolo um para as micobactérias cultiváveis, pois, o processo de extração foi mais rápido que o do protocolo dois. Numa tentativa de aumentar a concentração de DNA, as amostras foram incubadas por 12 horas a 55°C ao invés de apenas 2 horas (tabela 23 e figura 9). Das dez cepas, cujo DNA foi extraído, a relação A_{260}/A_{280} variou de 1,426 a 1,684 e a concentração variou de 31,2 a 352,3 µg/ml. As cepas *M. smegmatis* e *M. szulgai* apresentaram maior concentração de DNA, pois, a biomassa de partida foi maior que as demais, devido a motivos técnicos.

TABELA 23 – PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA EM µg/ml DETERMINADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA REFERENTES AS MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS

AMOSTRA	A_{260}/A_{280}	CONCENTRAÇÃO (µg/ml)
<i>M. kansasii</i>	1,533	44,9
<i>M. phlei</i>	1,472	57,7
<i>M. goodii</i>	1,546	49,5
<i>M. fortuitum</i>	1,498	87,4
<i>M. bovis</i>	1,684	46,0
<i>M. smegmatis</i>	1,552	352,3
<i>M. szulgai</i>	1,426	120,6
<i>M. terrae</i>	1,434	31,2
<i>M. avium</i>	1,488	35,0
<i>M. sp</i> ⁽¹⁾	1,474	45,1

(1) Amostra de cultura proveniente de lesão de paciente hanseniano.

FIGURA 9 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8% DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS



Linhas 1: *M. avium*; 2: *M. bovis*; 3: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 4: *M. gordonae*; 5: *M. kansasii*; 6: *M. phlei*; 7: *M. smegmatis*; 8: *M. sp*; 9: *M. szulgai*; 10: *M. terrae*.

5.2 PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS

A figura 10 mostra um hansenoma humano obtido por biópsia da pele.

FIGURA 10 – HANSENOMA HUMANO OBTIDO POR BIÓPSIA



5.2.1 Pesquisa de Bacilos Ácido-Resistentes

As frações sobrenadante e sedimento, de todas as biópsias, foram submetidas à pesquisa de bacilos ácido-resistentes. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 24.

Na fração sobrenadante foram encontrados bacilos ácido-resistentes em 12 hansenomas (52,17%), enquanto, que no sedimento foram encontrados bacilos em 16 (69,56%) amostras.

Das 24 amostras, incluindo a amostra de tatu, apenas em 13 foram detectados bacilos ácido-resistentes, tanto na fração sobrenadante quanto na fração sedimento. Em quatro amostras observaram-se raros bacilos, que somente foram visualizados no sedimento presos as células do tecido.

TABELA 24 – PESQUISA DE BACILOS ÁCIDO-RESISTENTES NAS FRAÇÕES SOBRENADANTE E SEDIMENTO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS

AMOSTRA	FRAÇÃO: SOBRENADANTE	FRAÇÃO: SEDIMENTO
CPPI 1	+	+
CPPI 2	-	-
CPPI 3	-	-
CPPI 4	-	-
CPPI 5	+	+
CPPI 6	+	+
CPPI 7	+	+
CPPI 8	+	+
CPPI 9	+	+
CPPI 10	+	+
CPPI 11	-	-
CPPI 12	-	-
CPPI 13	-	-
CPPI 14	+	+
CPPI 15	-	+
CPPI 16	-	+
CPPI 17	-	+
CPPI 18	+	+
CPPI 19	-	+
CPPI 20	+	+
CPPI 21	+	+
CPPI 22	-	-
CPPI 23	+	+
Tatu	+	+

NOTAS: + = presença de bacilos.
 - = ausência de bacilos.

Nas figuras 11 e 12 são mostrados bacilos no material obtido do sobrenadante e sedimento. Maior quantidade de detritos celulares foram observadas na fração sedimento em relação a fração sobrenadante.

FIGURA 11 – BACILOS ÁCIDO-RESISTENTES DA FRAÇÃO SOBRENADANTE CORADOS PELA TÉCNICA ZIEHL-GABBET OBSERVADOS NO AUMENTO DE 1000X

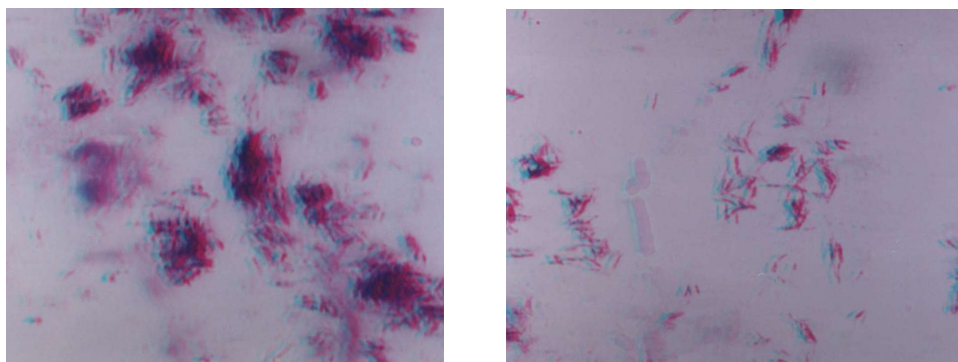
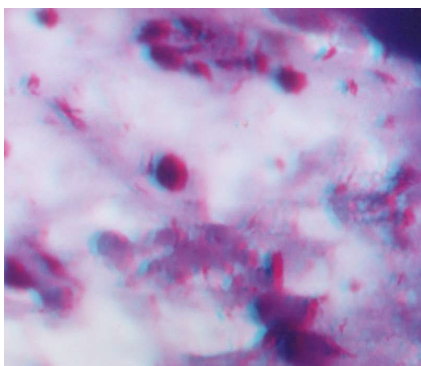


FIGURA 12 – BACILOS ÁCIDO-RESISTENTES DA FRAÇÃO SEDIMENTO CORADOS PELA TÉCNICA ZIEHL-GABBET OBSERVADOS NO AUMENTO DE 1000X



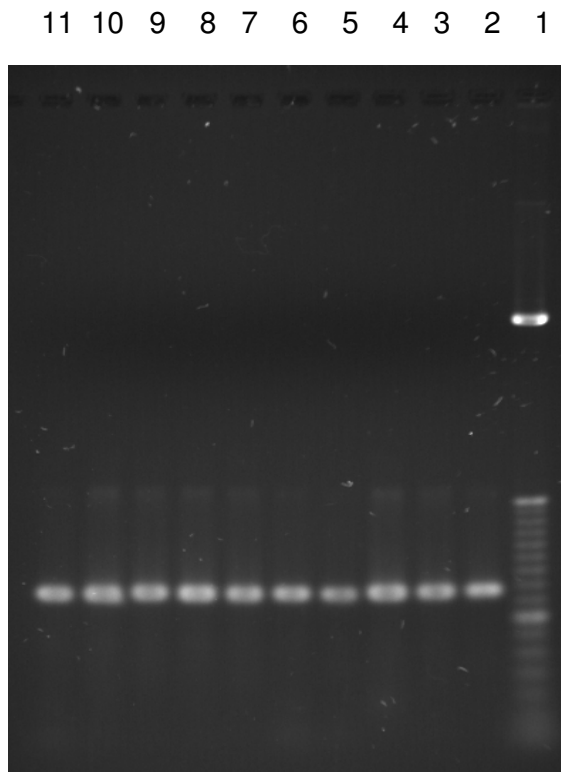
5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

5.3.1 Amplificação do Fragmento do Gene *hsp65*

As cepas de micobactérias cultiváveis e amostras provenientes de tecido foram submetidas à amplificação do fragmento de 439 pb do gene *hsp65* (figuras 13 e 14). As figuras exemplificam apenas algumas amostras.

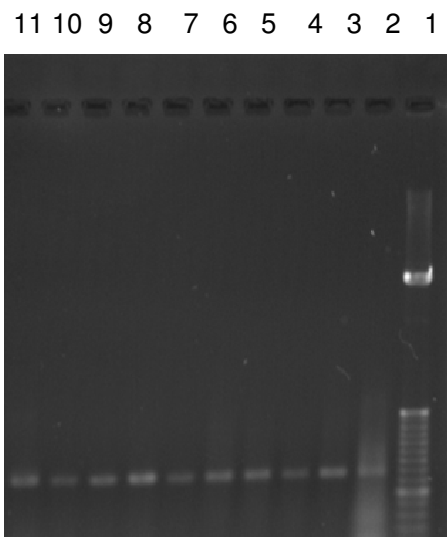
Das várias tentativas de amplificação e usando os diferentes programas descritos em Material e Métodos, amplificou-se o fragmento alvo para as seguintes amostras: CPPI 1, CPPI 5, CPPI 6, CPPI 7, CPPI 8, CPPI 9, CPPI 10, CPPI 14, CPPI 18, CPPI 20, CPPI 21 e CPPI 23, a amostra proveniente de tatu e a cultura de paciente hanseniano. A tabela 25 aponta a fração da amostra cujo DNA foi amplificado.

FIGURA 13 – PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE *hsp65* EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: *M. smegmatis*; 3: *M. phlei*; 4: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 5: *M. szulgai*; 6: *M. kansasii*; 7: *M. avium*; 8: *M. terrae*; 9: *M. bovis*; 10: *M. gordonae*; 11: *M. sp.*

FIGURA 14 – PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE *hsp65* VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS.



Linhas 1: marcador de peso molecular 50 de pb; 2: CPPI 1; 3: CPPI 5; 4: CPPI 6; 5: CPPI 8; 6: CPPI 10; 7: CPPI 18; 8: CPPI 20; 9: CPPI 21; 10: CPPI 23; 11:Tatu.

TABELA 25 – AMOSTRAS, FRAÇÕES AMPLIFICADAS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE *hsp65*

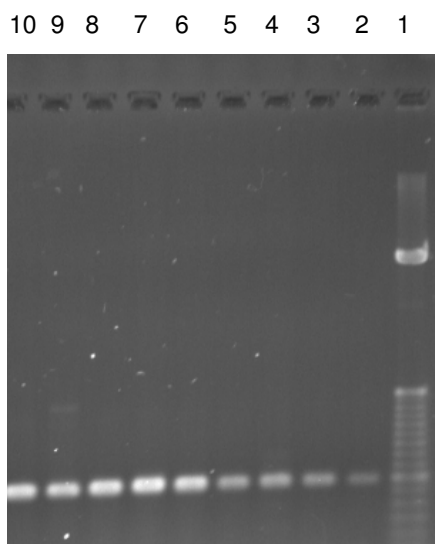
AMOSTRA	FRAÇÃO AMPLIFICADA	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO
CPPI 1	Sedimento	TD PCR de TD PCR
CPPI 5	Sedimento	PCR
CPPI 6	Sobrenadante	PCR
CPPI 7	Sobrenadante	TD PCR de TD PCR
CPPI 8	Sedimento	PCR
CPPI 9	Sedimento	TD PCR de TD PCR
CPPI 10	Sobrenadante	PCR
CPPI 14	Sobrenadante	PCR de PCR
CPPI 18	Sobrenadante	PCR
CPPI 20	Sobrenadante	PCR
CPPI 21	Sobrenadante	PCR
CPPI 23	Sobrenadante	PCR
Tatu	Sobrenadante	TD PCR de TD PCR

NOTA: TD PCR = *Touchdown* PCR.

5.3.2 Amplificação do Fragmento do Gene *rpoB*

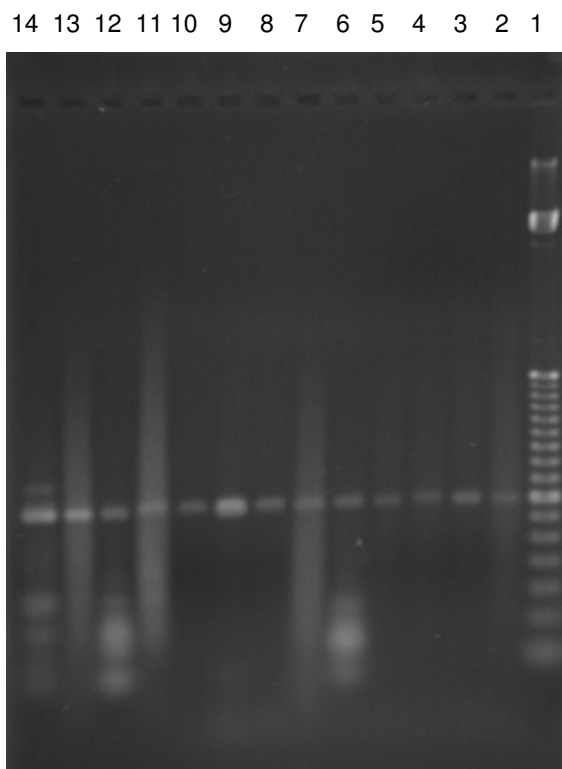
As cepas de micobactérias cultiváveis e amostras provenientes de tecido foram submetidas à amplificação do fragmento de 342 pb do gene *rpoB*. As figuras 15 e 16 apontam algumas das amostras amplificadas.

FIGURA 15 – PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE *rpoB* EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS CEPAS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 3: *M. phlei*; 4: *M. smegmatis*; 5: *M. avium*; 6: *M. gordonae*; 7: *M. szulgai*; 8: *M. terrae*; 9: *M. bovis*; 10: *M. tuberculosis*.

FIGURA 16 – PRODUTOS DE PCR DO FRAGMENTO DO GENE *rpoB* VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE A 1,6% DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE TECIDOS



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: CPPI 1; 3: CPPI 5; 4: CPPI 6; 5: CPPI 8; 6: CPPI 9; 7: CPPI 14; 8: CPPI 18; 9: CPPI 20; 10: CPPI 21; 11: CPPI 23; 12: Tatu; 13: *M. sp*; 14: CPPI 7.

Todas as amostras de referência foram amplificadas enquanto, as amostras clínicas que apresentaram amplificação do segmento alvo foram: CPPI 1, CPPI 5, CPPI 6, CPPI 7, CPPI 8, CPPI 9, CPPI 10, CPPI 14, CPPI 18, CPPI 20, CPPI 21 e CPPI 23, como também, a amostra de tecido de tatu e a amostra de cultura proveniente de paciente hanseniano. A tabela 26 evidencia a amostra e a correspondente fração cujo DNA foi amplificado.

TABELA 26 – AMOSTRAS, FRAÇÕES AMPLIFICADAS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE *rpoB*

AMOSTRA	FRAÇÃO AMPLIFICADA	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO
CPPI 1	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 5	Sedimento	TD PCR + hot start
CPPI 6	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 7	Sedimento	TD PCR de TD PCR + hot start
CPPI 8	Sedimento	TD PCR + hot start
CPPI 9	Sobrenadante	TD PCR de TD PCR + hot start
CPPI 10	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 14	Sobrenadante	TD PCR de TD PCR + hot start
CPPI 18	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 20	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 21	Sobrenadante	TD PCR + hot start
CPPI 23	Sobrenadante	TD PCR + hot start
Tatu	Sedimento	TD PCR de TD PCR + hot start

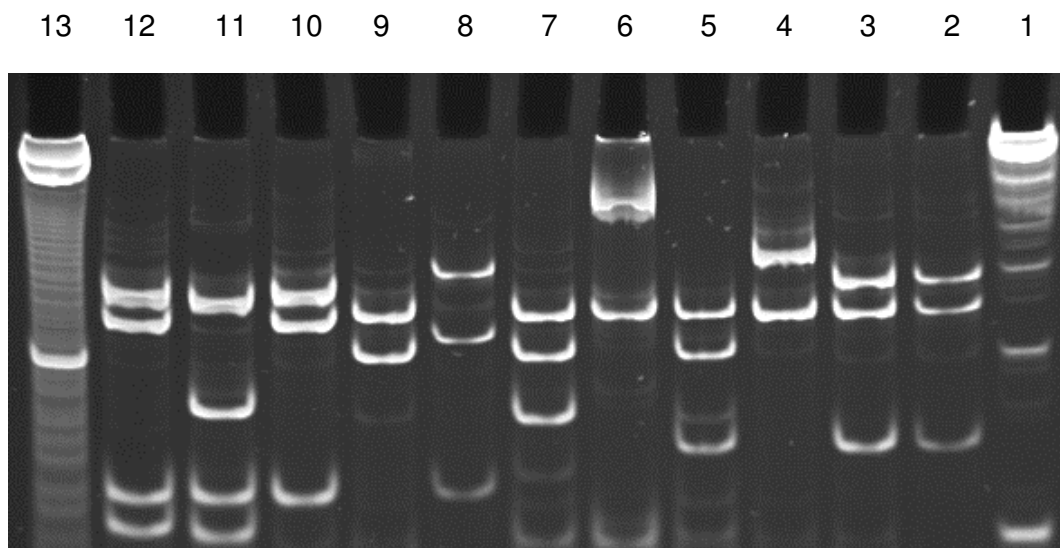
NOTA: TD PCR = *Touchdown* PCR.

5.4 POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

5.4.1 RFLP do Fragmento do Gene *hsp65*

Para o fragmento de 439 pb do gene *hsp65* submetido à digestão com a enzima *Hae* III, verificou-se o corte do produto de PCR em dois, três e quatro fragmentos e a combinação entre eles deu origem a dez genótipos para as cepas de referência (figura 17). Cada genótipo reuniu amostras que apresentaram os mesmos fragmentos de restrição e os fragmentos foram considerados idênticos quando se encontravam na mesma linha, independente do peso molecular.

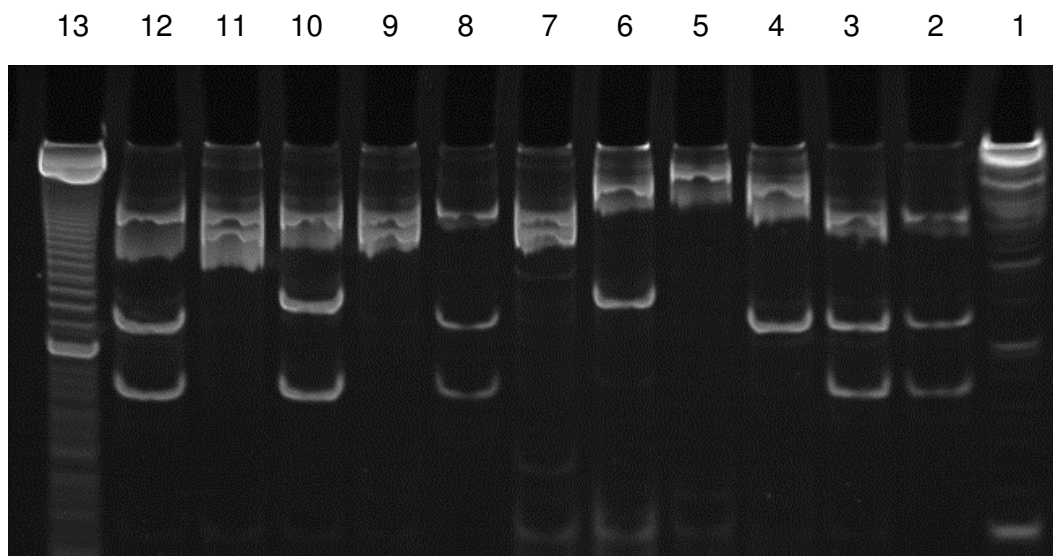
FIGURA 17 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: *M. tuberculosis*; 3: *M. bovis*; linha 4: *M. terrae*; linha 5: *M. szulgai*; linha 6: *M. leprae*; linha 7: *M. kansasii*; linha 8: *M. gordonae*; linha 9: *M. avium*; linha 10: *M. smegmatis*; linha 11: *M. phlei*; linha 12: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; linha 13: marcador de peso molecular de 10 pb.

A digestão do produto da PCR de 439 pb do gene *hsp65* com a enzima de restrição *Bst* EII produziu dois ou três fragmentos para as cepas de referência exceto para a cepa *M. szulgai*, em que não se observou a digestão. O número de genótipos gerados foram seis (figura 18).

FIGURA 18 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: *M. tuberculosis*; 3: *M. bovis*; 4: *M. terrae*; 5: *M. szulgai*; 6: *M. leprae*; 7: *M. kansasii*; 8: *M. gordonae*; 9: *M. avium*; 10: *M. smegmatis*; 11: *M. pheli*; 12: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 13: marcador de peso molecular de 10 pb.

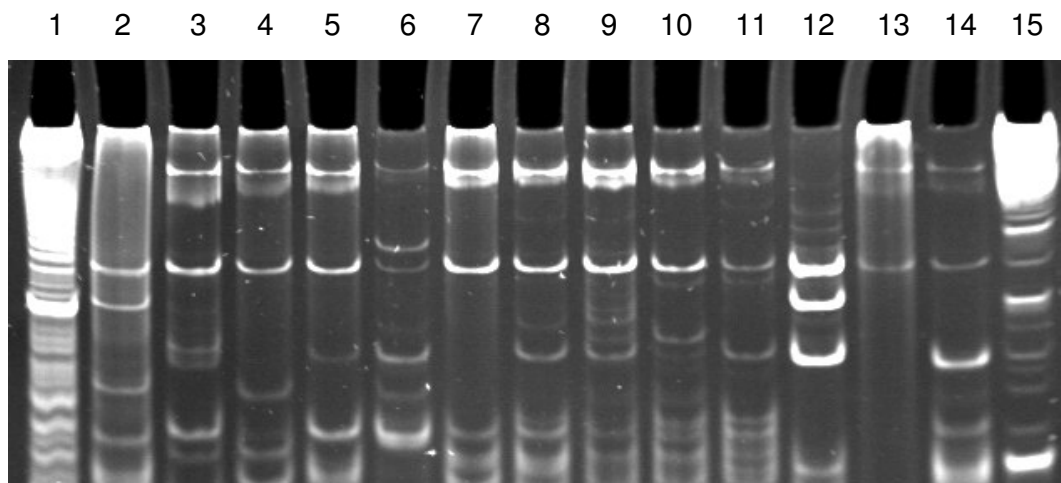
A tabela 27 apresenta o tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR do gene *hsp65* após restrição com as enzimas *Hae* III e *Bst* EII para as cepas de referência.

TABELA 27 – FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 439 pb DO GENE *hsp65* PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA

CEPA DE REFERÊNCIA	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM pb	
	<i>Hae</i> III	<i>Bst</i> EII
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	135, 116, 59, 52	230, 112, 87
<i>M. phlei</i>	129, 80, 59, 51	230, 192
<i>M. smegmatis</i>	131, 114, 58	230, 125, 87
<i>M. avium</i>	119, 99	224, 190
<i>M. gordonae</i>	147, 107, 59	242, 113, 88
<i>M. kansasii</i>	119, 99, 78	230, 192
<i>M. leprae</i> Thai-53	274, 121	338, 126
<i>M. leprae</i> ML1	284, 120	344, 127
<i>M. szulgai</i>	120, 99, 70	Não digeriu
<i>M. terrae</i>	160, 119	332, 111
<i>M. bovis</i>	140, 120, 70	230, 112, 87
<i>M. tuberculosis</i>	142, 121, 70	230, 114, 88

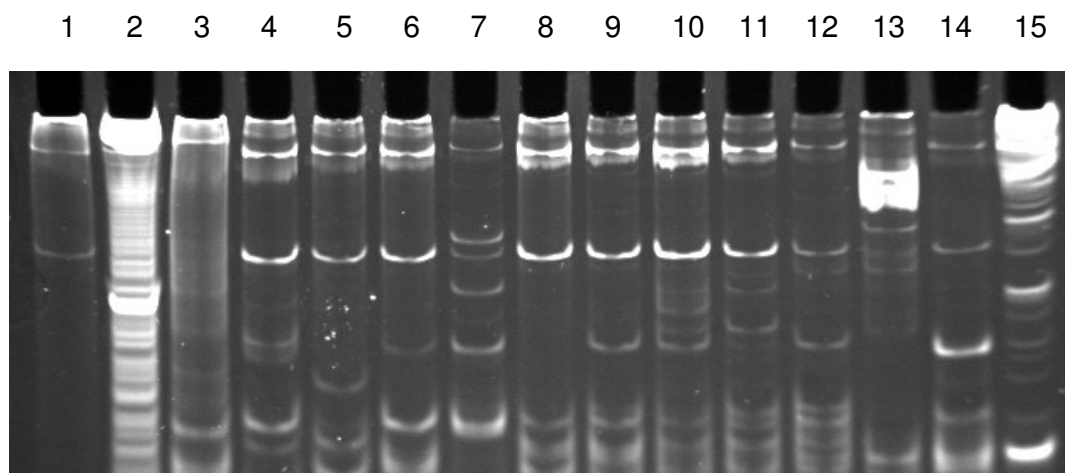
A partir do perfil de digestão obtido com as cepas de referência, comparou-se este padrão de fragmentos com o perfil de digestão gerado com as amostras clínicas para identificação de micobactérias (figuras 19 e 20). Estas figuras evidenciam a maioria das amostras.

FIGURA 19 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 10 pb; 2: CPPI 1; 3: CPPI 5; 4: CPPI 6; 5: CPPI 8; 6: CPPI 9; 7: CPPI 10; 8: CPPI 18; 9: CPPI 20; 10: CPPI 21; 11: CPPI 23; 12: *M. sp*; 13: ML1; 14: Tatu; 15: marcador de peso molecular de 50 pb, ML1 = amostra cedida pela FIOCRUZ.

FIGURA 20 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%



Linhas 1: ML1; 2: padrão de peso molecular de 50 pb; 3: CPPI 1; 4: CPPI 5; 5: CPPI 6; 6: CPPI 8; 7: CPPI 9; 8: CPPI 10; 9: CPPI 18; 10: CPPI 20; 11: CPPI 21; 12: CPPI 23; 13: *M. sp*; 14: Tatu; 15: padrão de peso molecular de 50 pb; ML1 = amostra cedida pela FIOCRUZ.

A tabela 28 apresenta o tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR do gene *hsp65* após restrição com as enzimas *Hae* III e *Bst* EII para as amostras clínicas.

TABELA 28 – FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 439 pb DO GENE *hsp65* PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS

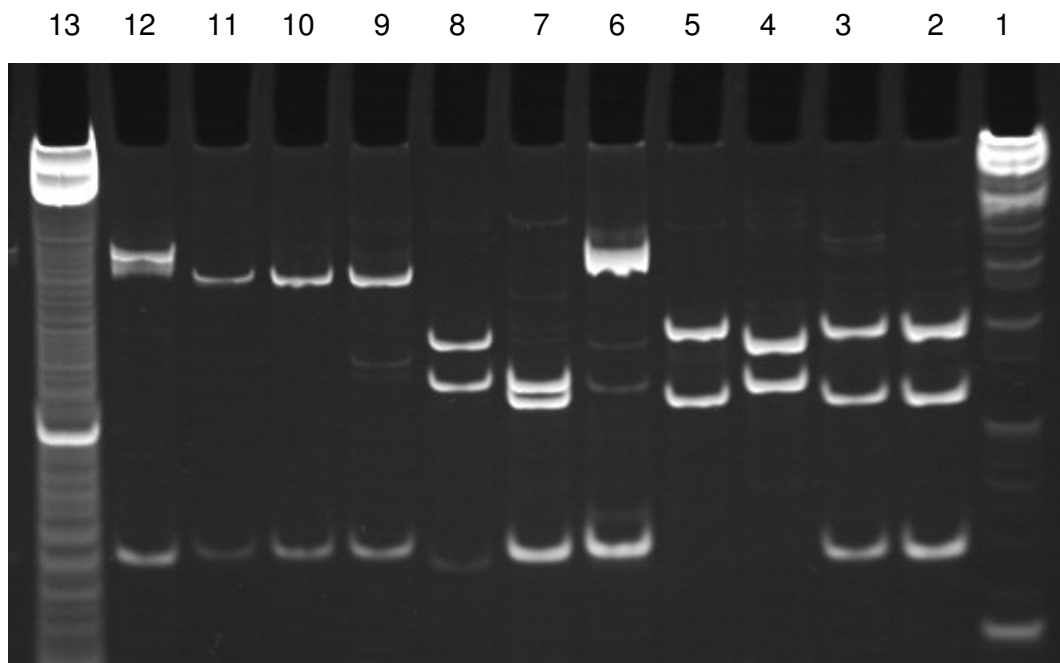
AMOSTRA	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM pb	
	<i>Hae</i> III	<i>Bst</i> EII
CPPI 1	118, 97, 68	Não digeriu
CPPI 5	265, 119	344, 127
CPPI 6	274, 119	350, 127
CPPI 7	274, 119	344, 127
CPPI 8	265, 119	344, 127
CPPI 9	274, 119	362, 127
CPPI 10	265, 119	344, 127
CPPI 14	265, 119	344, 127
CPPI 18	265, 120	344, 127
CPPI 20	265, 119	344, 127
CPPI 21	274, 120	350, 127
CPPI 23	284, 120	356, 128
<i>M. sp</i>	119, 98, 77	236, 193
Tatu	284, 121	350, 130

Analisando os resultados do RFLP para o fragmento do gene *hsp65*, verificou-se que para as amostras CPPI 5, CPPI 6, CPPI 7, CPPI 8, CPPI 9, CPPI 10, CPPI 14, CPPI 18, CPPI 20, CPPI 21 e CPPI 23 e para a amostra de tatu foi identificado *M. leprae*. Para a amostra CPPI 1, detectou-se *M. szulgai* e para a amostra de cultura isolada de paciente hanseniano observou-se *M. kansasii*.

5.4.2 RFLP do Fragmento do Gene *rpoB*

Para o fragmento de 342 pb do gene *rpoB* submetido a digestão com a enzima *Hae* III, verificou-se o corte do produto de PCR em dois e três fragmentos e formação de seis genótipos para as cepas de referência (figura 21).

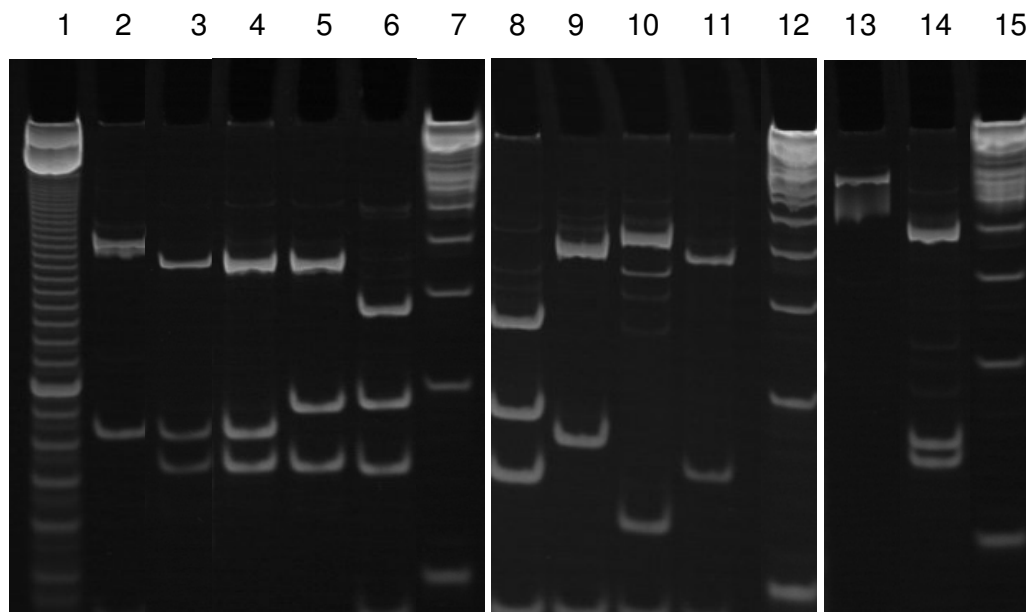
FIGURA 21 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Hae* III PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb ; 2: *M. tuberculosis*; 3: *M. bovis*, 4: *M. terrae*; 5: *M. szulgai*; 6: *M. leprae*; 7: *M. goodii*; 8: *M. avium*; 9: *M. smegmatis*; 10: *M. phlei*; 11: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 12: *M. kansasii*; 13: marcador de peso molecular de 10 pb.

A digestão do produto da PCR de 342 pb do gene *rpoB* com a enzima de restrição *Bst* UI produziu dois ou três fragmentos para as cepas de referência, exceto para a cepa *M. kansasii*, em que não se observou a digestão. O número de genótipos gerados foram nove (figura 22, tabela 29).

FIGURA 22 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Bst* UI PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA VISUALIZADO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 10 pb; 2: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*; 3: *M. gordonae*; 4: *M. szulgai*; 5: *M. terrae*; 6: *M. bovis*; 7: marcador de peso molecular de 50 pb; 8: *M. tuberculosis*; 9: *M. avium*; 10: *M. smegmatis*; 11: *M. phlei*; 12: marcador de peso molecular de 50 pb; 13: *M. kansasii*; 14: *M. leprae*; 15: marcador de peso molecular de 50 bp.

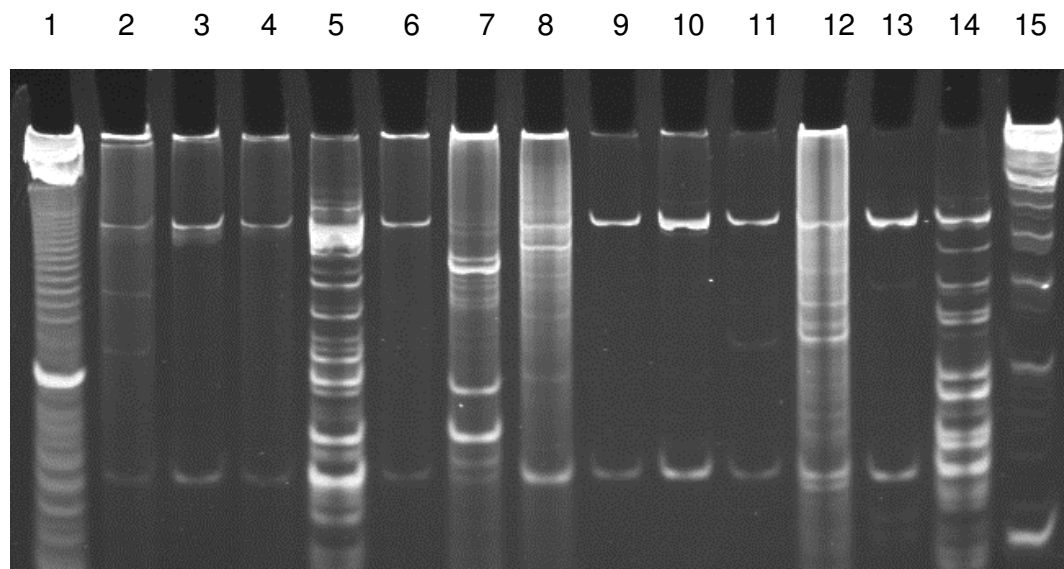
A tabela 29 apresenta o tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR do gene *rpoB* após restrição com as enzimas *Hae* III e *Bst* UI para as cepas de referência.

TABELA 29 – FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 342 pb DO GENE *rpoB* PARA AS CEPAS DE REFERÊNCIA

CEPA DE REFERÊNCIA	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM pb	
	<i>Hae</i> III	<i>Bst</i> UI
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	192, 71	193, 87
<i>M. phlei</i>	189, 71	189, 78
<i>M. smegmatis</i>	189, 71	229, 67
<i>M. avium</i>	141, 121	199, 87
<i>M. gordonae</i>	119, 112, 70	176, 87, 78
<i>M. kansasii</i>	227, 69	Não digeriu
<i>M. leprae</i> Thai-53	227, 71	191, 78, 72
<i>M. leprae</i> ML1	238, 69	198, 77, 72
<i>M. szulgai</i>	145, 113	173, 88, 79
<i>M. terrae</i>	139, 119	174, 94, 79
<i>M. bovis</i>	146, 114, 70	139, 95, 78
<i>M. tuberculosis</i>	145, 114, 70	139, 94, 78

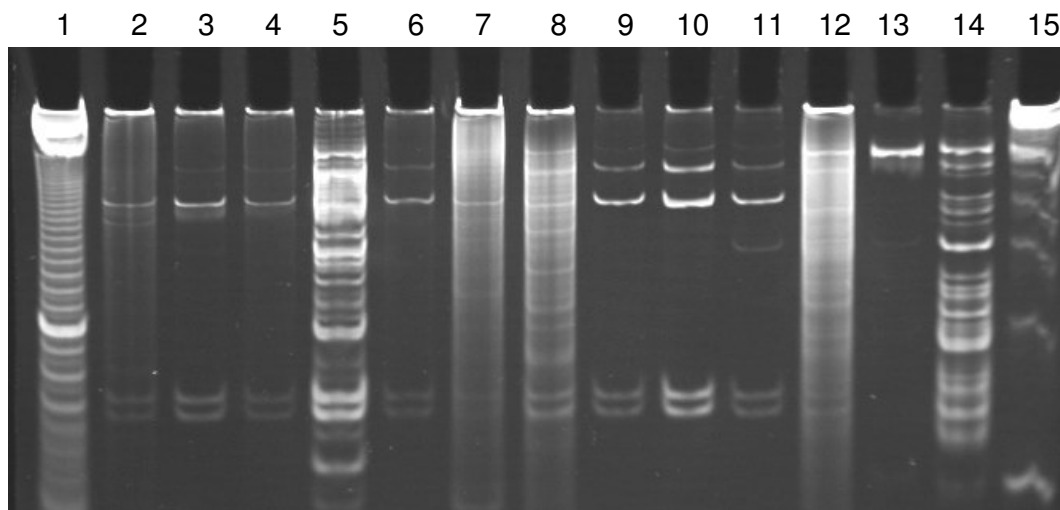
O perfil de digestão obtido com as cepas de referência foi comparado com o perfil de digestão gerado com as amostras clínicas para identificação de micobactérias (figuras 23 e 24). Estas figuras mostram a maioria das amostras.

FIGURA 23 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Hae* III PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: CPPI 1; 3: CPPI 5; 4: CPPI 6; 5: CPPI 7; 6: CPPI 8; 7: CPPI 9; 8: CPPI 14; 9: CPPI 18; 10: CPPI 20; 11: CPPI 21; 12: CPPI 23; 13: *M. sp*; 14: Tatu; 15: marcador de peso molecular de 50 pb; ML1 = amostra cedida pela FIOCRUZ.

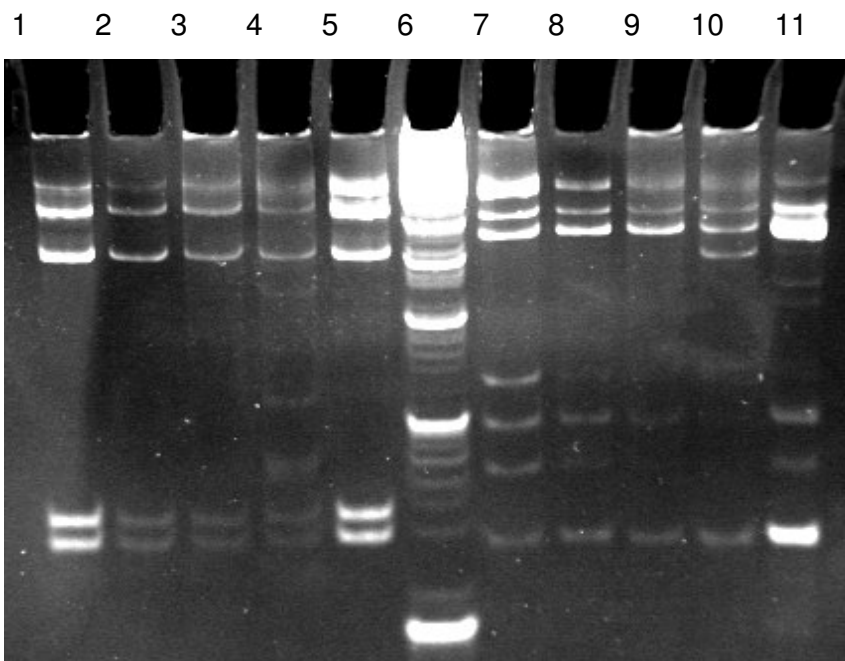
FIGURA 24 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Bst* UI PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8%



Linhas 1: marcador de peso molecular de 50 pb; 2: CPPI 1; 3: CPPI 5; 4: CPPI 6; 5: CPPI 7; 6: CPPI 8; 7: CPPI 9; 8: CPPI 14; 9: CPPI 18; 10: CPPI 20; 11: CPPI 21; 12: CPPI 23; 13: *M. sp*; 14: Tatu; 15: marcador de peso molecular de 50 pb; ML1 = amostra cedida pela FIOCRUZ; T = tatu.

Os produtos da PCR das amostras CPPI 7, CPPI 9, CPPI 14, CPPI 23, tatu e ML1 foram purificados, pois, o RFLP destas amostras apresentou um arraste. Após a purificação, o RFLP foi repetido e os resultados são mostrados na figura 25.

FIGURA 25 – PERFIL DA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR PARA O FRAGMENTO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Hae* III E *Bst* UI PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS VISUALIZADOS EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8% APÓS PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR



Linhas 1 a 5: produtos de PCR digerido com *Bst* UI: 1: ML1; 2: Tatu; 3: CPPI 23; 4: CPPI 14; 5: CPPI 7; linha 6: padrão de peso molecular de 50 pb; linhas 7 a 11: produtos de PCR digeridos com *Hae* III: 7: ML1; 8: Tatu; 9: CPPI 23; 10: CPPI 14; 11: CPPI 7; ML1 = amostra cedida pela FIOCRUZ.

A tabela 30 apresenta o tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR do gene *hsp65* após restrição com as enzimas *Hae* III e *Bst* UI para as amostras clínicas.

TABELA 30 – FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DE 342 pb DO GENE *rpoB* PARA AS AMOSTRAS CLÍNICAS

AMOSTRA	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM pb	
	<i>Hae</i> III	<i>Bst</i> UI
CPPI 1	236, 148, 111, 69	198, 176, 85, 76, 71
CPPI 5	232, 69	198, 76, 71
CPPI 6	236, 68	198, 77, 72
CPPI 7	236, 68	198, 77, 72
CPPI 8	236, 69	205, 78, 73
CPPI 9	241, 68	198, 77, 73
CPPI 10	241, 68	198, 78, 72
CPPI 14	227, 68	198, 78, 72
CPPI 18	241, 69	200, 78, 73
CPPI 20	232, 69	198, 78, 73
CPPI 21	241, 69	205, 78, 73
CPPI 23	232, 69	198, 78, 73
<i>M. sp</i>	236, 69	Não digeriu
Tatu	241, 69	215, 78, 72

Analisando os resultados do RFLP para o fragmento do gene *rpoB* verificou-se que para as amostras CPPI 5, CPPI 6, CPPI 7, CPPI 8, CPPI 9, CPPI 10, CPPI 14, CPPI 18, CPPI 20, CPPI 21 e CPPI 23 e para a amostra de tatu foi identificado *M. leprae*. Para a amostra CPPI 1, além de *M. leprae*, detectou-se *M. szulgai* e para a amostra de cultura isolada de paciente hanseniano observou-se *M. kansasii*.

A tabela 31 resume os dados de tratamento, baciloscopia, PCR e RFLP dos dois alvos moleculares para cada doador de hansenoma.

TABELA 31 – RESUMO DOS DADOS DOS PACIENTES DOADORES DE HANSENOMA NO QUE REFERE AO TRATAMENTO, BACILOSCOPIA, PCR E RFLP

continua

PACIENTE	TRATAMENTO	PERÍODO TRATAMENTO	ALTA	BACILOSCOPIA		PCR <i>hsp65</i>	PCR <i>rpoB</i>	RFLP <i>hsp65</i>	RFLP <i>rpoB</i>
				Sobrenadante	Sedimento				
CPPI 1	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
CPPI 2	Sim	4 meses (clofazimina)	Alta	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	<i>M. leprae</i> N.A.
CPPI 3	Sim	5 meses (clofazimina)	Alta	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 4	Não	N.A.	Alta	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 5	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 6	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 7	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 8	Sim	4 dias (PQT/MB)	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 9	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 10	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 11	Não	N.A.	Alta	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 12	Sim	9 meses (PQT/MB)	N.A.	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 13	Sim	4 meses (PQT/MB)	N.A.	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 14	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 15	Sim	2 meses (PQT/MB)	N.A.	-	+	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 16	Não	N.A.	Alta	-	+	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 17	Sim	24 meses (Esquema Alternativo há 3 meses)	N.A.	-	+	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.
CPPI 18	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>
CPPI 19	Sim	⁽¹⁾ 11 meses	N.A.	-	+	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.

TABELA 31 – RESUMO DOS DADOS DOS PACIENTES DOADORES DE HANSENOMA NO QUE REFERE AO TRATAMENTO, BACILOSCOPIA, PCR E RFLP

PACIENTE	TRATAMENTO	PERÍODO TRATAMENTO	ALTA	BACILOSCOPIA		PCR <i>hsp65</i>	PCR <i>rpoB</i>	RFLP <i>hsp65</i>	conclusão	
				Sobrenadante	Sedimento				RFLP <i>rpoB</i>	
CPPI 20	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>	
CPPI 21	Sim	1 mês (PQT/MB)	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>	
CPPI 22	Não	N.A.	Alta	-	-	Negativa	Negativa	N.A.	N.A.	
CPPI 23	Não	N.A.	N.A.	+	+	Positiva	Positiva	<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i>	

NOTAS: N.A. = não aplicável.

+ = presença de bacilos ácido-resistentes.

- = ausência de bacilos ácido-resistentes.

PQT/MB = poliquimioterapia esquema multibacilar.

(1) Paciente teve diagnóstico de hanseníase indeterminada com baciloscopia negativa, tratou por seis meses com PQT/PB (poliquimioterapia esquema paucibacilar). Dois meses depois, teve diagnóstico de hanseníase virchowiana, com baciloscopia positiva e recebeu PQT/MB. O período de tratamento até a coleta foi de cinco meses.

Os produtos de RFLP cortados pelas diferentes enzimas de restrição foram avaliados pela análise fenética, usando o índice de Jaccard e a técnica aglomerativa UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means*). Para o gene *hsp65* cortado com a enzima *Bst* EII verificou-se que as amostras clínicas formaram três grupos com distância de 100% de dissimilaridade. O primeiro agrupou a cepa CPPI 1, o segundo separou a cepa *M. sp* e o terceiro grupo reuniu 12 amostras clínicas (figura 26). No dendrograma construído com os dados das cepas referência observou-se que *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. gordonae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* formaram um único *cluster* e *M. phlei*, *M. avium* e *M. kansasii* também apresentam 100% de similaridade (figura 27).

FIGURA 26 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bst* EII, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *hsp65*, DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

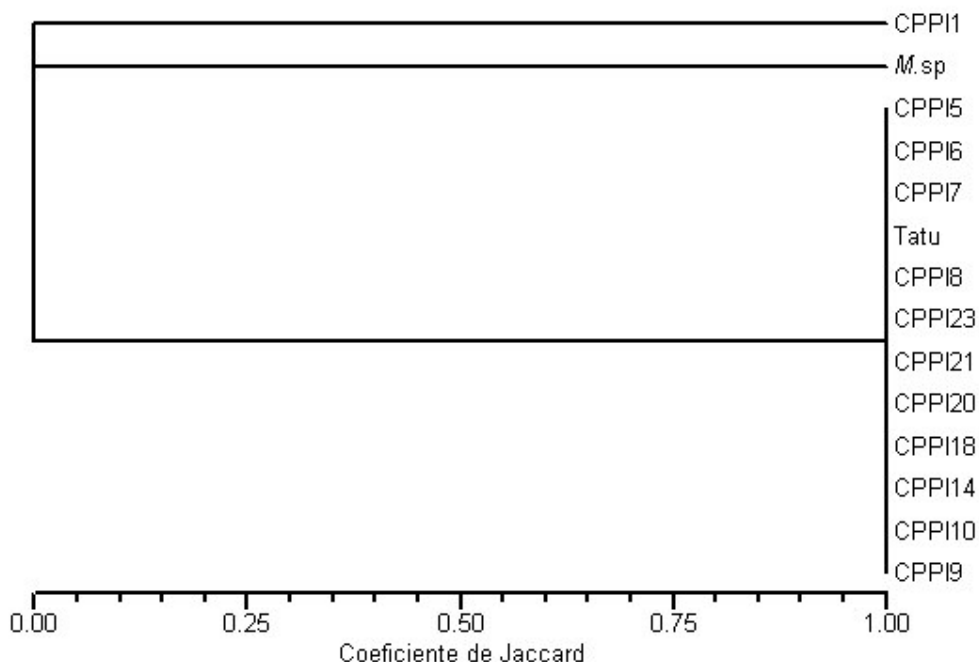
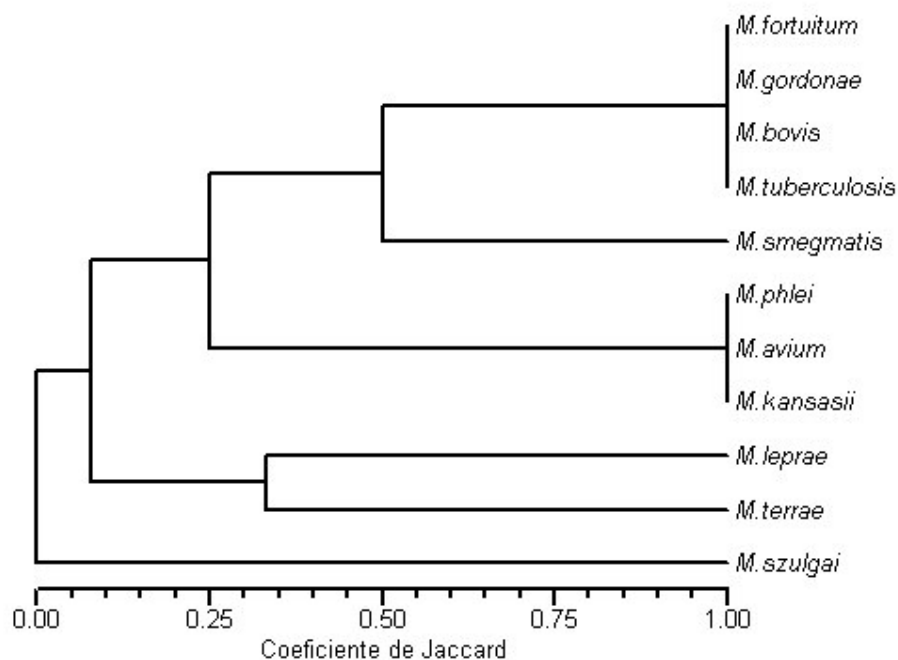


FIGURA 27 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bst* EII, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *hsp65*, DAS CEPAS REFERÊNCIAS



O corte com a enzima de restrição *Hae* III do produto de PCR das amostras clínicas formou dois *clusters*, sendo que 12 amostras se reúnem num único *cluster* e as amostras CPPI 1 e *M. sp* se agruparam com cerca de 50% de similaridade (figura 28). Para as cepas referências esta enzima permite a separação de todas as espécies, com exceção de *M. tuberculosis* e *M. bovis* (figura 29).

FIGURA 28 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *hsp65*, DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

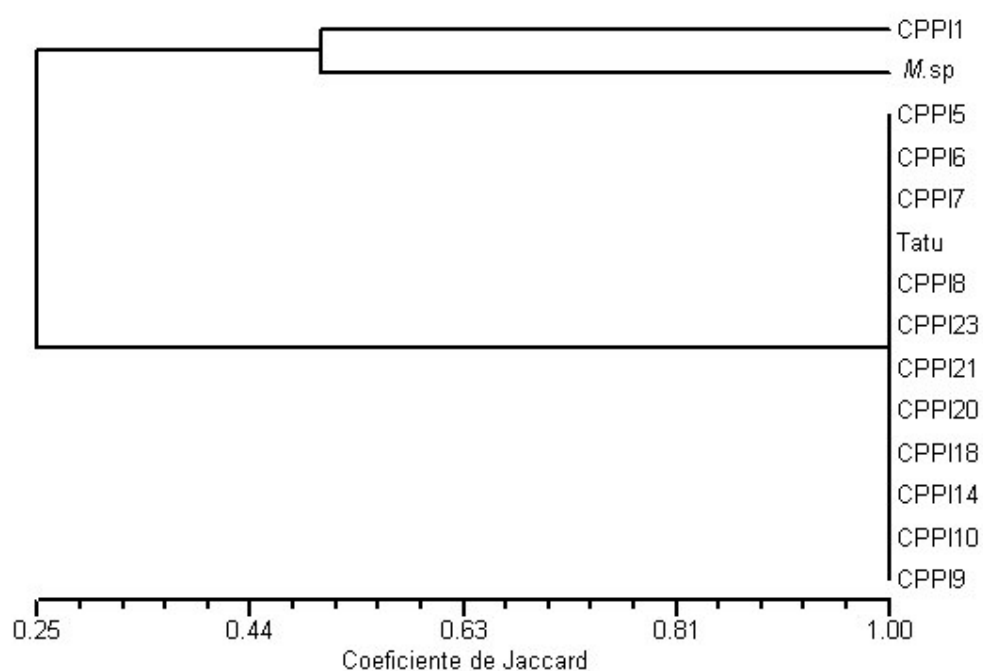
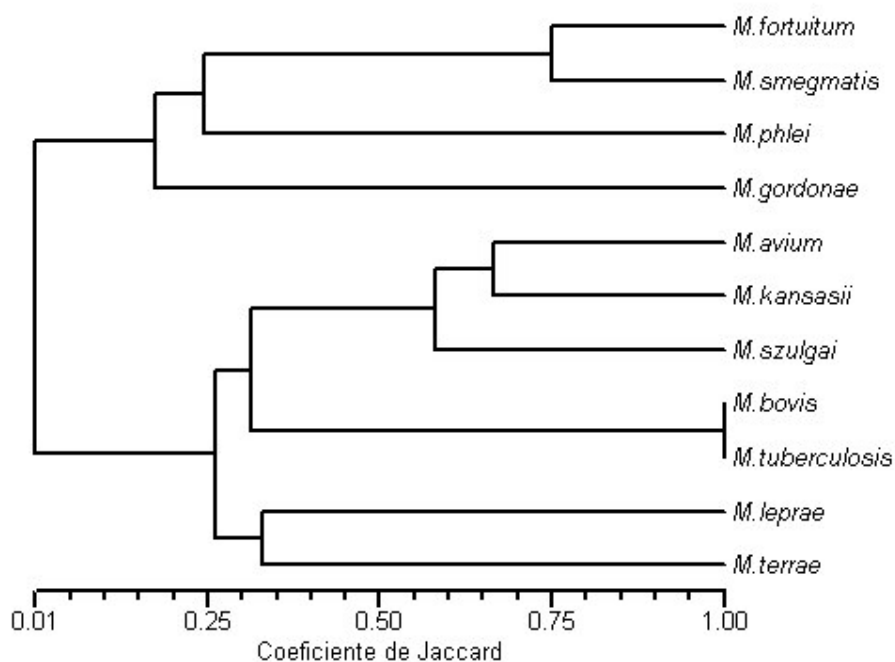


FIGURA 29 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *hsp65*, DAS CEPAS REFERÊNCIAS



Para o gene *rpoB* as amostras clínicas se dividem em três grupos ao ser cortado pela enzima *Bst* UI, sendo que 13 amostras se reúnem num único *cluster* e a amostra CPPI 1 apresenta 80% de similaridade e *M. sp* se isola completamente. Para as cepas referências *M. tuberculosis* e *M. bovis* apresentam 100% de similaridade, assim como *M. gordonae* e *M. szulgai* (figuras 30 e 31).

FIGURA 30 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bst* UI, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *rpoB*, DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

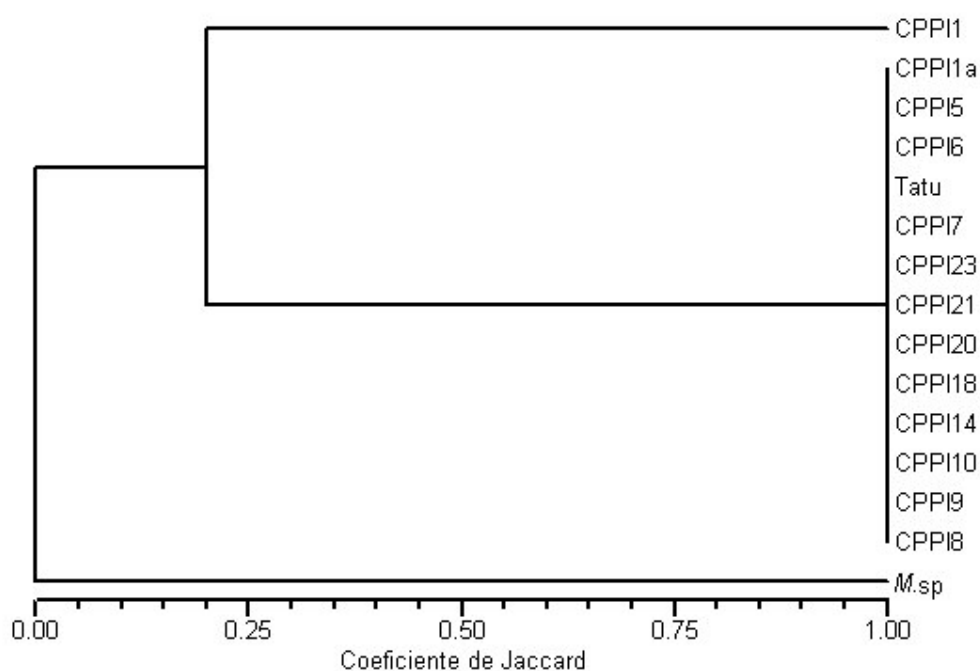
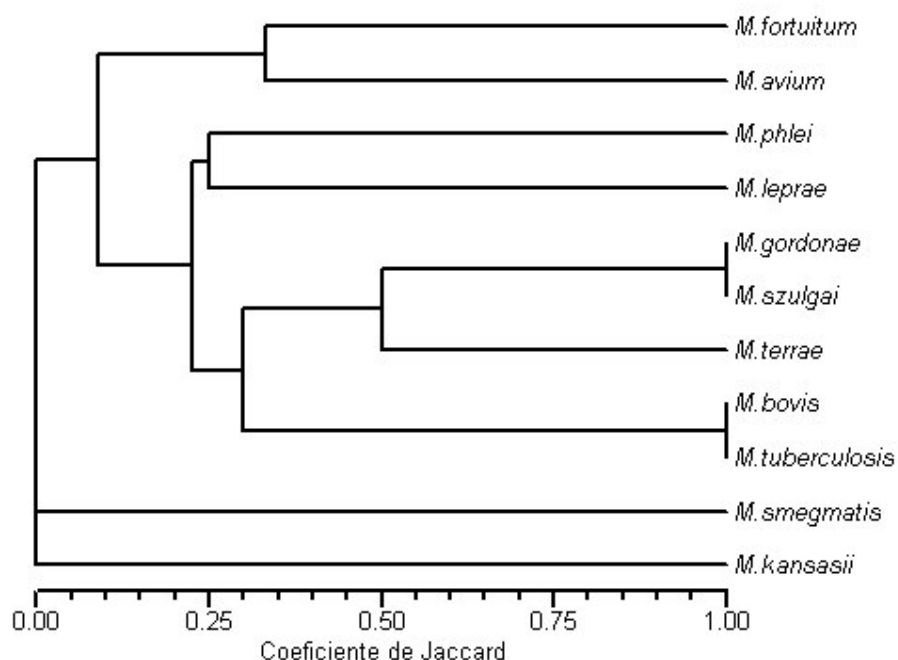


FIGURA 31 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bst* UI, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *rpoB*, DAS CEPAS REFERÊNCIAS



O dendrograma construído com os dados de RFLP com a enzima de restrição *Hae* III mostra 100% de similaridade entre todas as amostras clínicas com exceção do isolado CPPI 1 (figura 32). Dentre as cepas referências *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. phlei* e *M. smegmatis* apresentaram 100% de similaridade, o que foi também observado para *M. kansasii*/*M. leprae*, *M. bovis*/*M. tuberculosis* e *M. avium*/*M. terrae* (figura 33).

FIGURA 32 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *rpoB*, DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

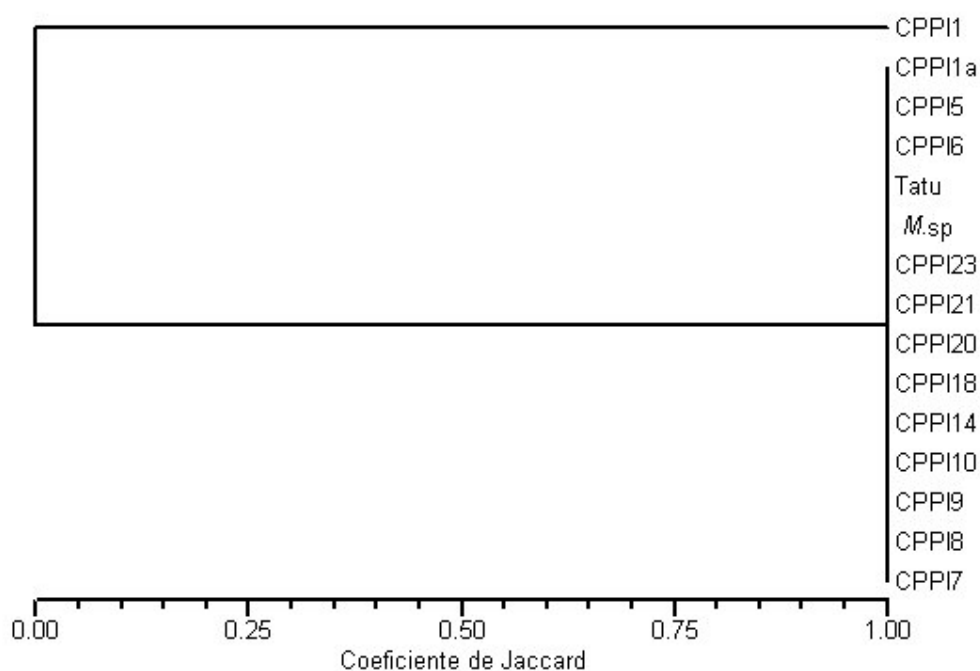
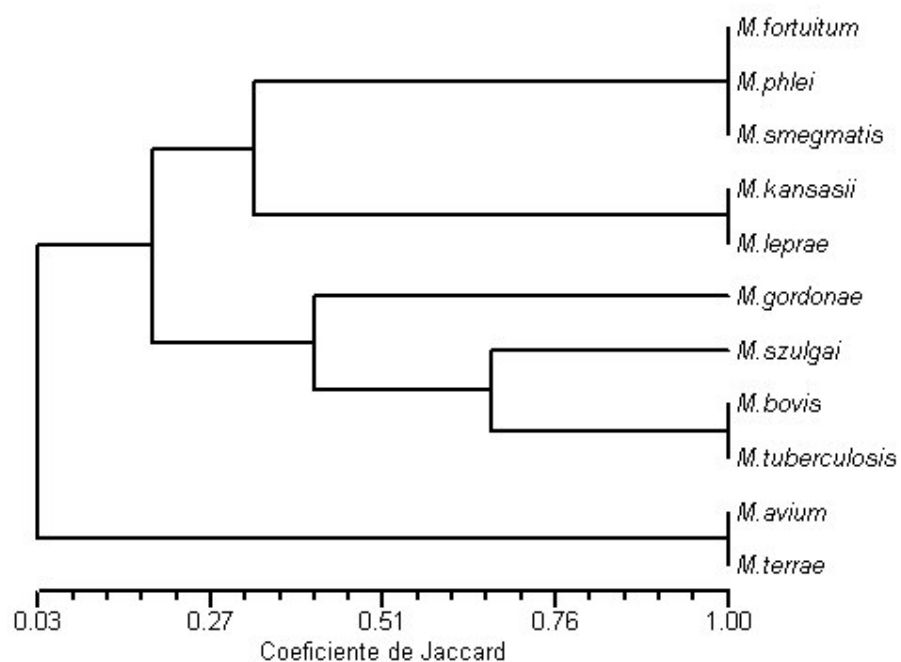


FIGURA 33 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae* III, AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA O GENE *rpoB*, DAS CEPAS REFERÊNCIAS



O dendrograma construído para as amostras clínicas, levando em consideração os dados obtidos para os dois genes e enzimas de restrição, mostra a formação de quatro grupos. Um grupo reuniu 12 isolados, a cepa CPPI1a foi separada em um grupo, assim como a cepa CPPI1 e a cepa *M. sp* (figura 34). Para as cepas referências, graças a somatória dos dois genes e das três enzimas de restrição foi possível verificar a individualização de todas as espécies de *Mycobacterium*, com exceção de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (figura 35).

Quando os dados das amostras clínicas são comparados às cepas referência verifica-se que o isolado *M. sp* se agrupa ao *cluster* de *M. kansasii*, a amostra clínica CPPI 1 se agrupa ao *cluster* de *M. szulgai* e as demais amostras se agrupam à *M. leprae* (figura 36).

FIGURA 34 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (*Hae* III, *Bst* UI, *Bst* EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES *rpoB* E *hsp65*, DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

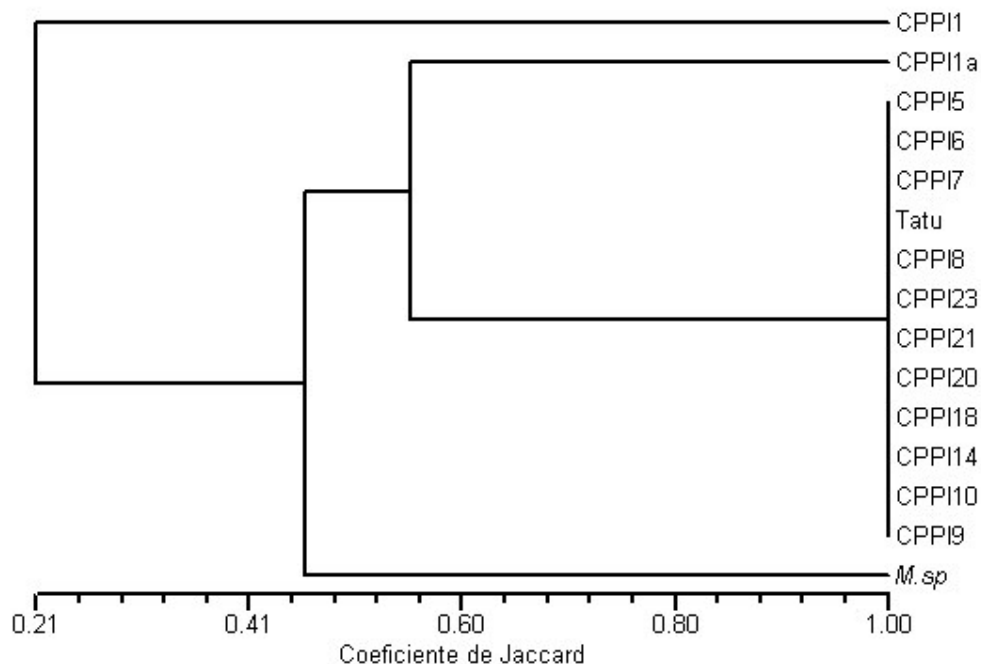


FIGURA 35 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (*Hae* III, *Bst* UI, *Bst* EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES *rpoB* E *hsp65* PARA CEPAS REFERÊNCIAS

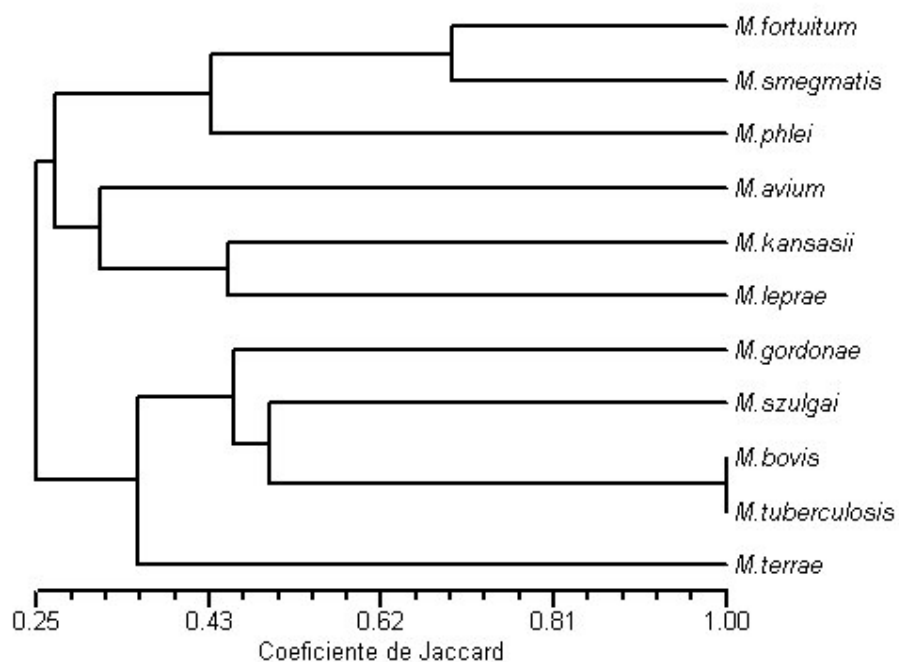
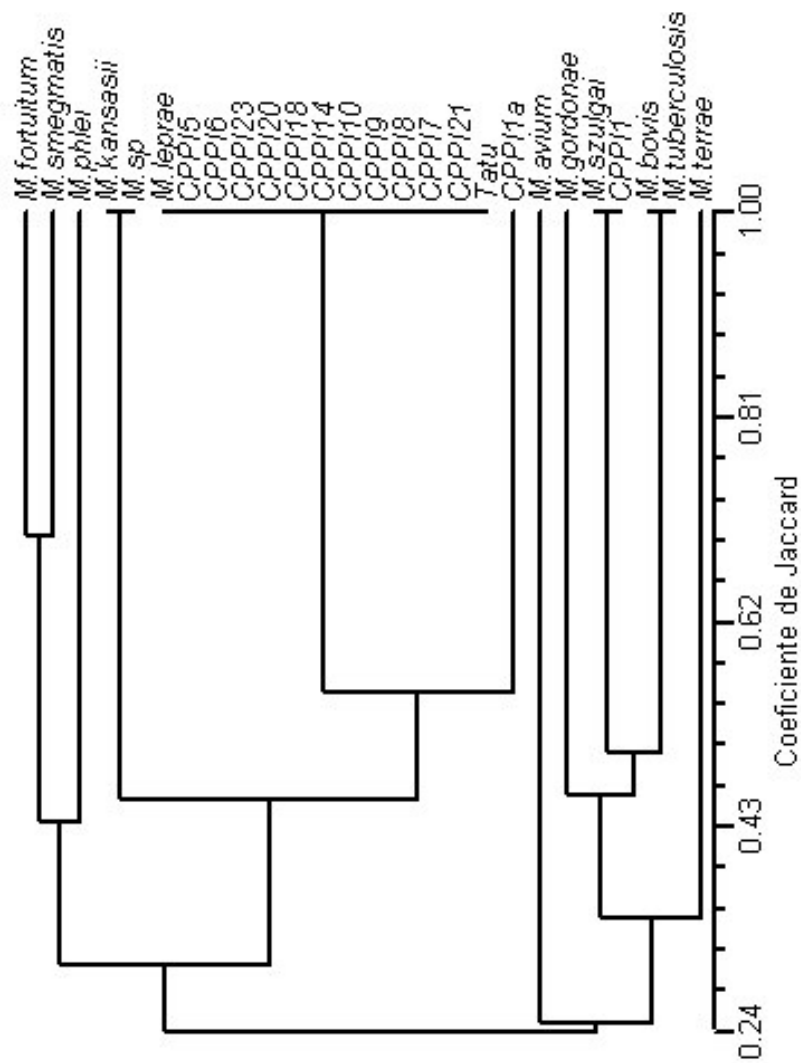


FIGURA 36 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (*Hae* III, *Bst* UI, *Bst* EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES *rpoB* E *hsp65* PARA AMOSTRAS CLÍNICAS E CEPAS

REFERÊNCIA



6 DISCUSSÃO

Para a classificação da hanseníase e avaliação da resposta imunológica do paciente ao *M. leprae* usa-se a mitsudina ou o antígeno de Mitsuda. No Brasil, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), é o único fornecedor deste antígeno para o Ministério da Saúde, e sua produção é realizada a partir de hansenomas de pacientes com hanseníase virchowiana.

Utilizando intradermicamente o antígeno de Mitsuda, pode-se observar *in vivo* dois tipos de hipersensibilidade tardia, conhecidas como reação de Fernandez e reação de Mitsuda. A reação de Mitsuda depende da concentração bacilar e da integridade dos bacilos que compõem a mitsudina (ARRUDA *et al.*, 1985).

Ao realizar a contagem bacilar, através da observação em microscópio, de uma suspensão corada, não é possível identificar o *M. leprae*, pois, outras micobactérias, se presentes, também irão se corar.

Para verificar se os hansenomas, a matéria-prima para a produção da mitsudina, continham apenas *M. leprae*, realizou-se a identificação micobactérias, extraídas dos tecidos, por biologia molecular.

Escolheram-se dois métodos para a identificação de micobactérias, o PCR-RFLP de fragmento do gene *hsp65* e PCR-RFLP de fragmento do gene *rpoB*. A seleção das seqüências-alvo foi baseada no número de espécies já identificadas com estes métodos em estudos prévios, incluindo *M. leprae*. Muitas seqüências-alvo estudadas não incluem *M. leprae*, pois os estudos foram baseados em micobactérias isoladas de meios de cultura. O alvo mais usado é o gene codificante para 16S RNAr, mas, algumas espécies não podem ser distinguidas e os resultados podem ser ambíguos devido a presença de dois genes 16S RNAr diferentes em um organismo. Além disso, o gene *hsp65* para uso em PCR-RFLP é o alvo mais investigado e validado. Optou-se por dois métodos ao invés de apenas um, pois, segundo HÄFNER *et al.* (2004), a identificação correta de organismos necessita da combinação de dois ou mais métodos. Conforme os autores, resultados discordantes podem ser obtidos com diferentes métodos.

No estudo realizado, identificou-se *M. szulgai*, em um dos 23 hansenomas, e *M. kansasii*, na cultura obtida a partir de lesão profunda de paciente com hanseníase virchowiana, o que correspondeu a 8% das amostras estudadas.

A presença de micobactérias na pele de pacientes com hanseníase foi investigada por SALEM *et al.* (1989). O estudo envolveu, além de pacientes hansenianos, indivíduos saudáveis. As amostras analisadas para pacientes com hanseníase foi biópsia de pele e para indivíduos saudáveis foi o lavado de antebraço e mãos. Após o processamento das amostras, as mesmas foram inoculadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ), LJ acrescido de piruvato e LJ acrescido de citrato férrico amoniacal e a identificação dos isolados foi baseada na velocidade de crescimento, produção de pigmentos, temperatura de crescimento, testes bioquímicos e no perfil de ácidos micólicos. As espécies, *M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. fortuitum*, além de isolados não identificados, foram encontradas em 37,5% das amostras nos indivíduos saudáveis. Nos pacientes com hanseníase apenas observou-se *M. avium-intracellulare*, que corresponderam a 11,1% das amostras.

Um outro estudo, com o objetivo de avaliar a flora micobacteriana em pacientes hansenianos, foi realizado por FANDINHO *et al.* (1991). As formas clínicas incluídas no estudo foram tuberculóide-tuberculóide, *borderline*-tuberculóide, *borderline-borderline*, lepromatosa-lepromatosa e indeterminada, sendo todos os pacientes não tratados. As amostras selecionadas foram linfa de dedos das mãos e lavado de mãos. O material coletado foi inoculado em meio LJ, LJ acrescido de piruvato e LJ acrescido de citrato férrico amoniacal e os isolados foram identificados por métodos convencionais. Em 13 de 89 pacientes foram identificadas micobactérias, incluindo dois casos em pacientes com a forma indeterminada, um caso com a forma tuberculóide-tuberculóide, dois casos com a forma *borderline-borderline* e oito casos com a forma lepromatosa-lepromatosa. Na linfa foram encontradas micobactérias em três amostras, que corresponderam as formas indeterminada, tuberculóide-tuberculóide e *borderline-borderline*. As micobactérias identificadas foram *M. gordonae*, micobactéria escotocromogênica de crescimento lento e micobactéria de crescimento rápido. No lavado de mãos foram encontradas micobactérias nas formas indeterminada, *borderline-borderline* e lepromatosa-lepromatosa, que foram *M. fortuitum*, *M. avium* e *M. scrofulaceum*.

SHARMA *et al.* (1995) isolaram e caracterizaram micobactérias cultiváveis de pele de pacientes com hanseníase. O estudo envolveu pacientes hansenianos com as formas *borderline-borderline* (BB), *borderline-lepromatosa* (BL), lepromatosa-

lepromatosa (LL), tuberculóide-tuberculóide (TT), *borderline*-tuberculóide (BT), e indeterminada (I), assim como pessoas sãs. As amostras utilizadas foram biópsia e linfa de lesões no caso de hansenianos e biópsia e linfa de pele normal nos controles. O método de identificação foi baseado em testes bioquímicos. De 129 amostras foram isolados 17 micobactérias em pacientes com hanseníase e dois em 50 indivíduos saudáveis. Os isolados foram: quatro isolados de *M. scrofulaceum* (todos de casos LL); três de *M. avium* (dois de casos LL e um em indivíduo saudável); um do complexo *M. avium-intracellulare* (um caso LL); dois de *M. gordonae* (um de BB e um de BT); *M. flavescens* (de BL); um de *M. fortuitum* (de BL); um de *M. chelonae* (de um caso de recidiva de BT); dois de *M. smegmatis* (em BL) e quatro de *M. phlei* (um BT, um BL, um LL e um em indivíduo saudável).

Portanto, trabalhos anteriores demonstravam a presença de micobactérias, principalmente *M. avium* e *M. scrofulaceum*, na pele de pacientes com hanseníase virchowiana. Os métodos de identificação utilizados nestes trabalhos, baseados no isolamento de microrganismos em meios de cultura, não permitiam detectar *M. leprae*, se presente, visto que, este organismo não é cultivável *in vitro*.

A metodologia padronizada no presente trabalho para a identificação de micobactérias usou num primeiro tempo cepas de referência e foi avaliando comparativamente os resultados aqui obtidos com aqueles de outros autores, que também utilizaram o método PCR-RFLP para o gene *hsp65* ou o método PCR-RFLP para o gene *rpoB* e verificaram-se variações.

Para o gene *hsp65*, o tamanho dos fragmentos de restrição gerados mostrou uma variação de tamanho comparado com aqueles anteriormente publicados (ver anexos 10 a 19).

Nos trabalhos realizados por TELENTI *et al.* (1993), TAYLOR *et al.* (1997) e DEVALLOIS, GOH e RASTOGI (1997), fragmentos menores que 60 pb foram desconsiderados da análise. No presente trabalho o uso do gel de poliacrilamida como substrato para eletroforese permitiu a detecção de fragmentos inferiores a 60 pb e conseqüentemente permitiu melhor distinção entre espécies que não poderiam ser separadas como, por exemplo, *M. fortuitum* (fragmentos observados: 135, 116, 59 e 52) e *M. smegmatis* (fragmentos observados: 131, 114, 58).

BRUNELLO *et al.* (2001) descreveram para o PCR-RFLP do gene *hsp65* com a enzima *Hae* III três fragmentos para *M. fortuitum* e para *M. avium*, enquanto,

as espécies estudadas nesse trabalho apresentaram quatro e dois fragmentos, respectivamente (ver anexo 17).

Também, para o gene *rpoB*, o tamanho dos fragmentos gerados para as cepas de referência mostrou uma variação em relação àqueles anteriormente publicados (ver anexos 20 e 21).

O algoritmo construído a partir do RFLP do gene *rpoB* por KIM *et al.* (2001) foi baseado na seqüência de nucleotídeos e não na análise dos fragmentos visualizados em gel de agarose ou poliacrilamida. Conforme HÄFNER *et al.* (2004) o perfil de restrição baseado na seqüência não necessariamente reflete o perfil observado no gel, o que de fato se observou.

Para algumas espécies como *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. szulgai* e *M. terrae* o terceiro fragmento descrito por KIM *et al.* (2001) com a enzima *Hae* III não foi detectado no presente estudo. A cepa *M. fortuitum* ATCC 6841, usada no presente trabalho, apresentou um perfil de restrição com a enzima *Bst* UI mais próximo àquele apresentado pela cepa *M. fortuitum* ATCC 49403. A cepa *M. fortuitum* ATCC 6841 apresentou o perfil de digestão 193, 87, enquanto o perfil descrito para a cepa *M. fortuitum* ATCC 6841 era 207, 55 e para a cepa *M. fortuitum* ATCC 4903 era de 207, 79.

Ocasionalmente, fragmentos de menor intensidade e que não possuíam correspondentes nos algoritmos propostos previamente foram observados e nestes casos, foram desconsiderados. Admite-se que esses fragmentos sejam resultado de amplificação inespecífica.

Uma das limitações do método PCR-RFLP é a falta de padronização, o que faz os padrões de digestão, até agora, descritos difíceis de comparar (HÄFNER *et al.*, 2004).

Alguns dos fatores principais que podem alterar a reprodutibilidade da técnica são: o tempo de corrida, concentração do gel e do tampão, concentração de DNA-alvo ou enzima, temperatura e tempo de digestão (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Segundo BARTLETT (2003) embora a mobilidade eletroforética da fita dupla de DNA é inversamente proporcional ao logaritmo do tamanho do fragmento, esta relação pode ser alterada pelo conteúdo GC e seqüência.

Outras limitações do método são a descrição de novos padrões para novas espécies e o alto polimorfismo apresentado por algumas espécies como *M. kansasii*

e *M. gordonae*, o que faz o padrão de digestão difícil de interpretar (HÄFNER *et al.*, 2004).

Frente a estas limitações, HÄFNER *et al.* (2004) sugerem a construção de coleções de cepas e bancos de dados próprios quando se emprega PCR-RFLP, proposta que renovamos aqui.

Os dois métodos empregados não permitem a diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis*, porém a distinção entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* é realizada com PCR-RFLP do gene *gyrB* como descrito por KASAI, EZAKI e HARAYAMA (2000) e CHIMARA, FERRAZOLI e LEÃO (2004).

Quando se analisa o perfil de restrição produzido pelas amostras clínicas, verifica-se a presença de fragmentos de baixa intensidade assim como fragmentos em intensidade significativa e diferente daqueles que caracterizam *M. leprae*, *M. szulgai* ou *M. kansasii*. Estes fragmentos produziram perfis que não correspondem a nenhum dos perfis apresentados em trabalhos prévios, embora sendo difícil essa comparação, por motivos já citados, provavelmente estes fragmentos sejam resultado de amplificações inespecíficas. Informações citadas a seguir em trabalhos prévios reforçam esta hipótese.

TAYLOR *et al.* (1997) afirmam a amplificação do fragmento do gene *hsp65* para *Nocardia braziliensis*, *Streptomyces albus* e *Rhodococcus equi* e provavelmente com outros gêneros de actinomicetos. DEVALLOIS, GOH e RASTOGI (1997) relatam que o gene *hsp65* está presente em todas as micobactérias e algumas outras espécies como *Nocardia* spp.

LEE *et al.* (2000) verificaram a amplificação de um fragmentos de 360 pb do gene *rpoB* em todas as micobactérias estudadas e em algumas outras bactérias como *Nocardia* e *Rhodococcus*. KIM *et al.* (2004) demonstraram a amplificação de um fragmento de 136 pb do gene *rpoB* em micobactérias assim como em cepas de *Tuskamurella*, *Rhodococcus* e *Nocardia*.

Estas amplificações com espécies diferentes de micobactérias ocorreram por que os gêneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Tuskamurella* e *Actinomyces* são relacionados filogeneticamente a micobactérias. Os membros do gênero *Mycobacterium* formam uma sublinhagem dos actinomicetos e outros gêneros incluídos são: *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Streptomyces*. Porém, a identificação de espécies outras que micobactérias não limita a aplicação do método

por PCR-RFLP, pois, os padrões de restrição de espécies não micobacterianas podem ser distinguidos daqueles de micobactérias (TAYLOR *et al.*, 1997). Portanto, a inclusão de espécies relacionadas ao gênero *Micobacterium* nos métodos PCR-RFLP permite a correta identificação de espécies.

A amostra CPPI 1 com o método PCR-RFLP *hsp65* apresentou o perfil de restrição compatível com *M. szulgai* e enquanto com o método PCR-RFLP *rpoB* apresentou perfil de restrição de *M. leprae* e *M. szulgai*. A princípio, esta diferença poderia ser devido a frações diferentes utilizadas na amplificação. Para o gene *hsp65* usou-se a fração sedimento e para o gene *rpoB* a fração sobrenadante. Mas, os resultados com a fração sedimento para o gene *rpoB* mostrou os mesmos resultados que a fração sobrenadante (dados não mostrados). Portanto, a diferença entre os resultados dos métodos não se deve ao uso de frações diferentes de amostras. Também, realizou-se, para algumas amostras, a identificação de micobactérias na fração sobrenadante e sedimento e verificou-se *M. leprae* em ambas as frações. Como referido anteriormente, resultados conflitantes podem ser obtidos entre métodos e por isso, a importância de usar dois ou mais métodos de identificação.

No dendrograma da figura 34 a amostra CPPIa (perfil correspondente ao *M. leprae*) ficou separada das demais amostras que também correspondiam ao *M. leprae*, pois, *M. leprae* foi identificado apenas com PCR-RFLP *rpoB*, enquanto, nas demais amostras, em ambos os genes o mesmo organismo foi identificado.

Ao analisar o perfil de restrição obtido com as amostras clínicas, cuja identificação forneceu *M. leprae*, não se observou polimorfismo, como também não se observou polimorfismo entre as cepas de *M. leprae* das amostras clínicas e as cepas de *M. leprae* de referência, indicando que todas as cepas de *M. leprae* estudadas são idênticas.

WILLIAMS, GILLIS e PORTAELS (1990) aplicaram a análise de RFLP em dez isolados de *M. leprae*, incluindo seis isolados humanos de quatro regiões distintas e um isolado de macaco Mangabey e três isolados de tatus, para avaliar a relação genética entre os isolados. A digestão do DNA cromossômico por endonucleases de restrição (*Eco* RI, *Bst* EII, *Pst* I e *Pvu* I) foi analisado usando sondas de DNA que codificam para as proteínas 12KD, 18KD, 28KD, 65KD e 70KD assim como sondas contendo seqüências repetidas específicas ao *M. leprae*. A

comparação das autoradiografias mostrou que os padrões RFLP foram todos idênticos, indicando que estes isolados não contêm polimorfismo com respeito aos sítios de restrição analisados. Além disso, o padrão RFLP de dois isolados humanos de *M. leprae* permaneceram inalterados após três ciclos de infecção experimental em tatu. Os resultados indicaram que os isolados de *M. leprae* foram indistinguíveis e sugerem homogeneidade entre os membros desta espécie.

Segundo SHIN *et al.* (2000) outros trabalhos, em que a análise RFLP usando várias sondas foi empregada, não mostraram diferenças entre os isolados de *M. leprae*. Padrões de polimorfismo de conformação de fita simples e seqüências de DNA da região entre 16S RNAr (RNA ribossômico) e 23S RNAr também foram idênticas em *M. leprae* de diferentes pacientes hansenianos multibacilares. O relato de uma classe de seqüências repetidas específica ao *M. leprae*, RLEP, sugeriu outras possibilidades de diferenciação entre isolados de *M. leprae*, pois, a amplificação por PCR destas seqüências mostrou diferentes intensidades e a ausência de seqüências RLEP no gene *pol(A)* de certos isolados de *M. leprae*.

MATSUOKA *et al.* (2000) estudaram a diversidade genética e a distribuição global de 51 isolados de *M. leprae*. Os isolados foram obtidos de pacientes de 12 regiões geográficas diferentes do mundo e dois foram obtidos de duas fontes não humanas. A análise se iniciou pela amplificação por PCR do gene *rpoT* seguido do seqüenciamento. Os isolados foram classificados em dois grupos baseados no número de cópias de seqüências repetidas em série. Os isolados do Japão (exceto Okinawa) e Coréia pertenceram a um grupo (quatro seqüências repetidas), enquanto aqueles do sudeste Asiático, Brasil, Haiti e Okinawa no Japão pertenceram ao segundo grupo (três seqüências repetidas). *M. leprae* obtido de tatu e macaco Mangabey revelou o segundo genótipo.

SHIN *et al.* (2000) identificaram seqüências repetidas TTC no genoma de *M. leprae*. O conjunto de *primers* designados para amplificar a região flanqueando as seqüências repetidas TTC revelou produtos de PCR de tamanhos diferentes, indicando que o número de cópias de seqüências repetidas em cada locus pode ser variável entre as cepas de *M. leprae* de pacientes hansenianos multibacilares. A análise da seqüência da região de seqüências repetidas TTC em cada cepa de *M. leprae* mostrou uma variação de 10 a 37 cópias.

MATSUOKA *et al.* (2004) encontraram isolados de *M. leprae* com diferentes números de cópias de seqüência repetidas TTC entre residentes do mesmo domicílio em povoados onde a hanseníase é endêmica e que alguns contatos abrigavam bacilos com um genótipo diferente daquele abrigado pelo paciente. O número de cópias de seqüências repetidas variou de 7 a 29 entre os isolados de *M. leprae*.

GROATHOUSE *et al.* (2004) identificaram nove seqüências repetidas em quatro isolados de *M. leprae* propagados em tatus e demonstraram que a amplificação destas seqüências combinada com métodos automatizados para eletroforese e para determinação de tamanho permitiu a discriminação entre isolados de *M. leprae*.

TRUMAN *et al.* (2004) avaliaram o número de cópias de cinco diferentes seqüências repetidas em série, incluindo seqüência repetida TTC estudada previamente, em 12 isolados de *M. leprae* derivados de pacientes de regiões diferentes assim como de tatus e macaco Mangabey e, também, examinaram a estabilidade do número de cópias destas seqüências com a passagem de cepas em camundongos *nude* e tatus. Foi encontrado diversidade em quatro seqüências repetidas no genoma de *M. leprae*. Relativamente pequena variação foi observada com a transferência interespecie de bacilos ou com a passagem a curto prazo de cepas em camundongos *nude* ou tatu. A variação genotípica foi mais comum após propagação a longo prazo em tatus. A maioria dos genótipos permaneceram estável em passagens, mas, a cepa *M. leprae* Thai-53 mostrou notável variabilidade em oito anos de passagem em camundongos *nude*. A cepa *M. leprae* Thai-53 foi isolada por M. Matsuoka (*National Infections Disease Institute*, Tokyo, Japão) em 1982 de leproma de um paciente tailandês e vem sendo mantida em passagens contínuas em camundongo *nude*, ou seja, há mais de 20 anos.

Segundo HAILE e RYON (2004) são necessários 10^4 organismos por grama de tecido para detecção por microscopia, portanto, a sensibilidade de exames microscópicos é baixa. A técnica de PCR é caracterizada pela sua alta sensibilidade, uma vez que a técnica, teoricamente, é sensível para detectar DNA de um único organismo em condições otimizadas. E estudos desde os anos 90 demonstram que a PCR é muito mais sensível que o exame microscópico para a detecção de *M. leprae*, visto que amostras com IB (índice bacteriológico) igual a zero apresentaram

com frequência PCR positiva. Alguns trabalhos sugeriram que a técnica poderia detectar um único bacilo, determinado por microscopia, mas, é possível que o número de microrganismos seja maior que aquele determinado por microscopia.

Neste estudo, amostras em que não foram detectados bacilos ácido-resistentes ou que apresentavam raros bacilos na microscopia, os DNAs também não foram amplificados. Nas amostras em que não foram observados bacilos, pode-se admitir que de fato nenhum bacilo estaria presente ou poderiam estar em número muito pequeno, o que não permitiu sua amplificação. Alternativamente, a não amplificação das amostras com nenhum ou poucos bacilos poderia ser devido a outros fatores tais como: a amostra coletada poderia não ser representativa da lesão ou de bacilos e a área da lesão escolhida para PCR poderia não conter bacilos devido a uma distribuição irregular de *M. leprae* em lesões. Depois de coletada, as amostras são colocadas em frascos contendo salina fenolada 0,5% e não se sabe quais são os efeitos desta solução sobre o DNA do bacilo. Para diminuir o risco de contaminação do manipulador foi realizada autoclavação por 120°C/20 minutos. Este processo poderia inviabilizar o DNA, ou liberar o material genético na solução e conseqüentemente ao ser descartada ter-se-ia perdido o DNA da amostra, pois, alguns protocolos de extração de DNA de micobactérias utilizam temperaturas não superiores a 100°C por 10 minutos para liberar o DNA. Depois da esterilização as amostras são armazenadas a -20°C em meio da mesma solução fisiológica fenolada até o momento do uso, podendo ter aí permanecido por meses a anos. Segundo SCOLLARD *et al.* (2006) as amostras adequadas para PCR são: amostras frescas e processadas imediatamente, congeladas a -80°C, fixadas em fixadores adequados por tempo determinado e/ou mantidas em parafina. Portanto, as condições e período de armazenamento dos hansenomas poderiam não ser ideais para preservação do DNA. Além disso, segundo SCOLLARD *et al.* (2006) biópsias de pacientes tratados não são amostras adequadas para PCR. Observou-se no presente trabalho que amostras provenientes de pacientes sem tratamento ou em tratamento iniciado há um mês foram positivas para PCR. As amostras de pacientes que já haviam completado o tratamento ou amostras de pacientes em tratamento por dois ou mais meses não foram positivas para PCR. Dados de WILLIAMS *et al.* (1992) corroboram nossos resultados, pois demonstraram que o sinal da PCR foi diminuído ou ausente em pacientes hansenianos após dois meses de tratamento. Conforme SCOLLARD,

GILLIS e WILLIAMS (1998) o tratamento com antimicobacterianos como rifampicina rapidamente mata o patógeno e conduz a degradação do DNA entre dois a três meses. Em adição, WIT *et al.* (1991) relataram que a resposta imune do hospedeiro poderia degradar o DNA de *M. leprae* e YOON *et al.* (1993) sugerem a presença de inibidores de PCR em tecidos de pele.

Portanto, acredita-se que a combinação destes vários fatores poderia responder o porquê da técnica de PCR foi negativa para as amostras com poucos bacilos.

Ressalva-se que os métodos de PCR-RFLP para o gene *hsp65* e *rpoB* são viáveis para uso na seleção de hansenomas para produção de mitsudina. Pois, a PCR foi positiva para as amostras com muitos bacilos e é isso que se procura nos hansenomas, além daqueles que contenham apenas *M. leprae*.

Portanto, a metodologia aqui padronizada poderá ser aplicada para a seleção de amostras adequadas para a produção do antígeno de Mitsuda, ou seja, amostras com numerosos bacilos, pois amostras com nenhum ou poucos bacilos estariam diluindo o preparado, e amostras contendo apenas *M. leprae*, pois a presença de outras micobactérias irão fornecer reação cruzada e respostas falso-positiva.

Além disso, a metodologia poderá ser utilizada como auxiliar no diagnóstico da hanseníase. Segundo SCOLLARD *et al.* (2006) a PCR é útil quando bacilos são vistos, mesmo se eles não são numerosos e, nesta situação não é garantia que a PCR será positiva, mas pode auxiliar. Deve ser levado em consideração para o diagnóstico as condições de colheita e armazenamento que preservem o DNA do organismo. O tempo de tratamento do paciente também deve ser levado em consideração ao pedir um diagnóstico de hanseníase por PCR. Para evitar erros na amostragem poderão ser realizados estudos de padronização do tamanho da biópsia ou quando PCR negativa, repetir testes com nova amostra, estudos estes que não puderam ser realizados neste trabalho devido a indisponibilidade de amostra. Além disso, poderão ser testados métodos de concentração de bacilos para aumentar a capacidade de detecção. Também, outros métodos de detecção de fragmentos amplificados, como a hibridização, poderiam ser examinados para aumentar a sensibilidade dos métodos.

Embora a mitsudina esteja entrando em desuso na prática clínica, por outro lado, a mitsudina provavelmente é o único antígeno de teste cutâneo que reflete a capacidade de um indivíduo de gerar uma resposta granulomatosa a antígenos micobacterianos. Neste contexto, a reação de Mitsuda se torna uma ferramenta valiosa de pesquisa em áreas de enorme impacto sobre a saúde humana, tais como a imunologia e a genética.

Quanto à identificação de micobactérias, a maioria dos trabalhos já publicados não inclui *M. leprae*, por ser um organismo não cultivável. Neste estudo, buscou-se identificar especialmente *M. leprae*. Um dos genes alvos usados foi o gene *hsp65*, que é um dos alvos aplicados para a identificação de micobactérias em geral e para identificar especificamente *M. leprae*. Por outro lado, o gene *rpoB* não é tido na literatura como específico para a identificação de *M. leprae*; nosso estudo sugere que este gene também possa ser de importância como alvo específico para a identificação do bacilo de Hansen.

Este trabalho pode vir a contribuir com o aumento da qualidade da mitsudina até então produzida, já que apenas amostras contendo apenas *M. leprae* podem ser selecionadas e incluídas no preparo do antígeno de Mitsuda. A detecção de outras espécies de micobactérias contaminantes das amostras biológicas utilizadas como fonte primária de mitsudina reforça a necessidade de desenvolvimento de antígenos alternativos, mais específicos em comparação com o antígeno de Mitsuda.

7 CONCLUSÕES

- a) Ambos os protocolos avaliados para a extração de DNA de micobactérias cultiváveis fornecerem DNA em boa quantidade e qualidade para uso na reação em cadeia da polimerase (PCR);
- b) Quanto se optar pelo emprego de PCR-RFLP cepas de referência devem ser utilizadas para compor o perfil padrão a ser usado para a identificação de isolados clínicos;
- c) A utilização de mais de um método de análise molecular é recomendada, uma vez que os resultados podem ser complementares.
- d) Os métodos PCR-RFLP do gene *hsp65* e do gene *rpoB* permitiram a identificação das espécies de micobactérias estudadas, com a exceção de *M. bovis* e *M. tuberculosis*;
- e) Em 12 dos 23 hansenomas (52,17%) foram encontrados bacilos ácido-resistentes quando avaliados por microscopia, na fração sobrenadante, fração esta usada na produção de mitsudina.
- f) A PCR foi positiva para micobactérias em 12 dos 23 hansenomas (52,17%), tanto para o fragmento de 439 pares de base (pb) do gene *hsp65* e para o fragmento de 342 pb do gene *rpoB*;
- g) Em um hansenoma identificou-se *M. szulgai* por PCR-RFLP do gene *hsp65* e, *M. szulgai* e *M. leprae* para PCR-RFLP do gene *rpoB*. Nos demais hansenomas identificou-se *M. leprae*;
- h) Não se observou polimorfismo entre os isolados de *M. leprae* estudados;
- i) Na cultura de micobactérias obtida de lesão cutânea profunda de paciente com hanseníase virchoviana identificou-se *M. kansasii*;
- j) A metodologia padronizada poderá ser utilizada para a triagem de hansenomas para o preparo de mitsudina com o objetivo de selecionar aquelas com numerosos bacilos e contendo apenas *M. leprae*.
- k) A metodologia poderá vir a ser utilizada, também, como auxiliar no diagnóstico da hanseníase, desde que sejam observadas as condições adequadas de amostras para PCR.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. *et al.* Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 133-145, 1998.
- ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-bases identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5699-5708, dec. 2003.
- ALI, M. K. *et al.* A study on trend of relapse in leprosy and factors influencing relapse. **Indian Journal of Leprosy**, v. 77, n. 2, p. 105-115, apr./jun. 2005.
- ALMEIDA, E. C. de *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of brazilian household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 509-512, aug. 2004.
- ANDRADE, V. L. G. **Evolução da hanseníase no Brasil e perspectivas para sua eliminação como um problema de saúde pública**. Rio de Janeiro, 1996. Tese de doutorado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 3, p.373-382, mai./jun. 2003.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP : o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. In : MARTIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto : Holos, 2001. p.143-152.
- ARRUDA, M. S. P. *et al.* Estudo das reações de Fernandez e Mitsuda em pacientes hansenianos e seus contatos. **Hansenologia Internationalis**, v. 10, n. ½, p. 23-31, 1985.
- AVANISS-AGHAJANI, E. *et al.* Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 98-102, jan. 1996.
- BARKER, K. **Na bancada**: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BARTLETT, J. M. S. Technical notes for the detection of nucleic acids. In: BARTLETT, J. M. S. STIRLING, D. 2nd. ed. **Methods in molecular biology**: PCR protocols. Totowa: Humana Press, 2003. p. 65-75.
- BEENHOUWER, H. de *et al.* Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2994-2998, nov. 1995.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 117-128, 2002.

BELISLE, J.T.; SONNENBERG, M.G. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 101, p. 31-44, 1998.

BEST, M. *et al.* Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 2234-2239, oct. 1990.

BLACKWOOD, Y. S. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2846-2852, aug. 2000.

BÖDDINGHAUS, B. *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1751-1759, aug. 1990.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy, **The Lancet**, v. 363, p. 1209-1219, apr. 2004.

BROWN-ELLIOTT, M. A.; WALLACE JUNIOR, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing micobactéria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716-746, oct. 2002.

BRUNELLO, F. *et al.* Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2799-2806, aug. 2001.

BUTLER, W. R.; GUTHERTZ, L. S. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 704-7026, oct. 2001.

BUTLER, W. R.; JOST, K. C.; KILBURN, J. O. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2468-2472, nov. 1991.

CHEMLAL, K. C.; PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 77-63, 2003.

CHEMOUILLI, P. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 64, n. 1, p. 1-5, mar. 1996.

CHEN, X. S. *et al.* Studies on risk of leprosy relapses in China: relapses after treatment with multidrug therapy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 67, n. 4, p. 379-387, dec. 1999.

CHIMARA, E. ; FERRAZOLI, L. ; LEÃO, S. C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 745-748, nov. 2004.

COLE, E. C. *et al.* Effect of methodology, dilution, and exposure time on the tuberculocidal activity of glutaraldehyde-based disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1813-1817, jun. 1990.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, feb. 2001.

DASANANJALI, K. Relapse of leprosy after multidrug therapy. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 79, n. 10, p. 635-639, oct. 1996.

DASANANJALI, K.; SCHREUDER, P. A.; PIRAVAVARAPORN, C. A study on the effectiveness and safety of the WHO/MDT regimen in the northeast of Thailand; a prospective study, 1984-1996. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 65, n. 1, p. 28-36, mar. 1997.

DAUENDORFFER, J. *et al.* Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1311-1315, mar. 2003.

DELLA-LATTA, P.; WEITZMAN, I. Mycobacteriology. In: ISENBERG, H. D. **Essential procedures for clinical microbiology**. Washington: ASM PRESS, 1998. p. 169-201.

DEVALLOIS, A. ; GOH, K. S. ; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2969-2973, nov. 1997.

DOBNER, P. *et al.* Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 866-869, apr. 1996.

DONHAM, K. J.; LEININGER, J. R. Spontaneous leprosy-like disease in a chimpanzee. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 136, n. 1, p. 132-136, 1977.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 177-182, 2001.

DUFFEY, P. S.; GUTHERTZ, L. S.; EVANS, G. C. Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1939-1943, aug. 1996.

EIGLMEIER, K. *et al.* The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Review**, v. 72, p. 387-398, 2001.

EUZÉBY, J. P. **List of procaryotic names with standing in nomenclature** : genus *Mycobacterium*. Disponível em : <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>> Acesso em: 23 nov. 2006.

FANDINHO, F. C. O. *et al.* Mycobacterial flora of skin in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 59, n. 4, p. 569-575, 1991.

FLEMING, D. O. Laboratory biosafety practices. In: FLEMING, D. O. *et al.* **Laboratory safety**: principles and practices. 2nd. ed. Washington: American society for Microbiology, 1995, p. 203-218.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's**: diagnostic microbiology. 3th. ed. St. Louis: Mosby, 1998.

FUKUSHIMA, M. *et al.* Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2605-2615, jun. 2003.

GELBER, R. H.; BALAGON, M. V. F.; CELLONA, R. V. The relapse rate in MB leprosy patients treated with 2-years of WHO-MDT is not low. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n.4, p. 493-500, dec. 2004.

GILCHRIST, M. J. R. Biosafety precautions for airborne pathogens. In: FLEMING, D. O. *et al.* **Laboratory safety**: principles and practices. 2nd. ed. Washington: American society for Microbiology, 1995, p. 67-75.

GINGERAS, T. R. *et al.* Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. **Genome Research**, v. 8, p. 435-448, 1998.

GODAL, T. Immunological aspects of leprosy: present status. **Progress in Allergy**, v. 25, p. 211-242, 1978.

GOH, K. S. *et al.* Rapid differentiation of "*Mycobacterium canettii*" from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3705-3708, oct. 2001.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, jul./ago. 2002.

GROATHOUSE, N. A. *et al.* Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1666-1672, apr. 2004.

GUERRERO, M. I. *et al.* Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 11, n. 4, p. 228-234, abr. 2002.

GUILLEMIN, I.; CAMBAU, E.; JARLIER, V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2145-2149, sep.1995.

GUTHERTZ, L. S. *et al.* Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1876-1881, jul. 1993.

HÄFNER, B. *et al.* Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 59-65, 2004.

HAILE, Y.; RYON, J. J. Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of *Mycobacterium leprae* 16S rRNA in clinical specimens. **Leprosy Review**, v. 72, p. 40-49, 2004.

HALDAR, A. *et al.* A study of relapse after MDT in district in West Bengal, India. **Indian Journal of Leprosy**, v. 75, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2003.

HALL, G. S. ; HOWARD, B. J. Mycobacteria. In : HOWARD, B. J. *et al.* **Clinical and pathogenic microbiology**. 2nd. ed. St. Louis : Mosby, 1994. p. 503-528.

HAN, X. Y. *et al.* Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. **American Journal Clinical Pathology**, v. 118, p. 796-801, 2002.

HANSEN, G. A. Causes of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 23, n. 3, p. 307-309, 1955.

HARTSKEERL, R. A.; WIT, M. Y. L. de; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2357-2364, 1989.

HAZBÓN, M. H. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. **Biomédica**, v. 24 (supl.), p. 149-162, 2004.

HERNANDEZ, S. M. *et al.* Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis using fluorescence capillary electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3688-3692, nov. 1999.

HOLBERG-PETERSEN, M. *et al.* Identification of clinical isolates of *Mycobacterium* spp. by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene: experience from a clinical laboratory. **APMIS**, v. 107, p. 231-239, 1999.

INTERNATIONAL CONGRESS LEPROLOGY, 6., 1953, Madrid. Classification: technical resolutions. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 21, p. 504-516, 1953.

IZUMI, S. *et al.* Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. **Vox Sanguinis**, v. 42, n. 5, p. 243-247, 1982.

JACOBSON, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Leprosy. **The Lancet**, v. 353, p. 655-660, feb. 1999.

JAMIL, S. *et al.* A colorimetric PCR method for the detection of *M. leprae* in skin biopsies from leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 62, n. 4, p. 512-520, 1994.

KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 301-308, jan. 2000.

KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian Journal Medical Research**, v. 120, p. 290-304, oct. 2004.

KEUHNE, R. W. *et al.* Primary barriers and personal protective equipment in biomedical laboratories. In: FLEMING, D. O. *et al.* **Laboratory safety**: principles and practices. 2nd. ed. Washington: American society for Microbiology, 1995, p. 145-170.

KIM, B. *et al.* Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1714-1720, jun. 1999.

KIM, B. *et al.* Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.6, p. 2102-2109, 2001.

KIM, B. *et al.* Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3. p. 1308-1312, mar. 2004.

KIM, H. *et al.* Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1649-1656, 2005.

KIM, S. J. *et al.* HLA and leprosy in Koreans. **Tissue Antigens**, v. 29, n. 3, p. 146-153, mar. 1987.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 39, n. 3, p. 693-702, jul./sep. 1971.

KIRSCHNER, P. *et al.* Genotypic identification of mycobacteria by nuclei acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2882-2889, nov. 1993.

KOH, W.; KWON, O J.; LEE, K. S. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. **Korean Journal of Radiology**, v. 3, p. 145-157, sep. 2002.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J. J. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1352-1356, may 1998.

LEBRUN, L. *et al.* Use of the INNO-LIPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2567-2574, jun. 2005.

LEE, H. *et al.* Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2966-2971, aug. 2000.

LEE, H. *et al.* Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2213-2218, may. 2003.

LI, H. Y. *et al.* Risk of relapse in leprosy after fixed-duration multidrug therapy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 65, n. 2, p. 238-345, jun. 1997.

MADEIRA, S.; ROSA, P. S. Hanseníase experimental. In: OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 19-26.

MARGARIDO-MARCHESE, L.; TEDESCO-MARCHESE, A. J.; RIVITTI, E. A. Hanseníase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratato de infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 736-760.

MARQUET, S.; SCHURR, E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 4, p. 479-483, 2001.

MARTÍNEZ, A. N. **Detecção de *Mycobacterium leprae* por PCR para o suporte no diagnóstico clínico da hanseníase**. Rio de Janeiro, 2005. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz.

MATSUOKA, M. *et al.* *Mycobacterium leprae* typing of genomic diversity and global distribution of genotypes. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 68, n. 2, p. 121-128, jun. 2000.

MATSUOKA, M. *et al.* Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 741-745, feb. 2004.

MEYERS, W. M.; GORMUS, B. J. WALSH, G. P. Nonhuman sources of leprosy. *International Journal of Leprosy*, v. 60, n. 3, p. 477-480, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hanseníase**: atividades de controle e manual de procedimentos. Brasília: Área Técnica de Dermatologia Sanitária, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano nacional de eliminação da hanseníase em nível municipal 2006-2010**. Brasília: Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase, 2006.

MIRA, M. T. *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in Vietnamese population. **Nature Genetics**, v. 33, p. 412-415, mar. 2003.

MIRA, M. T. *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* and *PACRG*. **Nature**, v. 427, p. 636-640, feb. 2004.

MIRANDA, R. N. *et al.* Cultivo de micobactérias em plasma humano. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 64, n. 6, p. 291-296, nov./dez. 1989.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, p. 417-426, 2004.

NOLTE, F. S.; NETCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 6th. ed. Washington: ASM PRESS, 1995. p. 400-437.

NORMAN, G.; JOSEPH, G.; RICHARD, J. Relapses in multibacillary patients treated with multi-drug therapy until smear negativity: findings after twenty years. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 71, n. 1, p. 1-7, mar. 2004.

OPAS. **Manual para controle da hanseníase**. Washington, 1983.

OPROMOLLA, D. V. A. História. In: OPRMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 1-5.

OPROMOLLA, D. V. A. Classificação. In: OPRMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 47-50.

OPROMOLLA, D. V. A. Manifestações clínicas e reações. In: OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 51-58.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 293-294, 2005.

PARKASH, O. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36Kda protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p.275-277, sep./oct. 2004.

PATEL, J. B. *et al.* Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 246-251, jan. 2000.

PATTYN, S. R. *et al.* Polymerase chain reaction amplifying DNA coding for species-specific rRNA of *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 60, n. 2, p. 234-243, 1992.

PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1913-1917, sep. 1990.

RAFI, A.; DONOGHUE, H. D.; STANFORD, J. L. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 63, n. 1, p. 42-47, 1995.

RAJALINGAM, R.; SINGAL, D.P.; MEHRA, N. K. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 2, p. 168-172, feb. 1997.

RASTOGI, N.; GOH, K. S.; BERCHEL, M. Species-specific identification of *Mycobacterium leprae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 2016-2019, jun. 1999.

RAVIGLIONE, M. C.; O'BRIEN, R. J. Tuberculose. In: FAUCI, A. S. **Harrison: medicina interna**. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1998. p. 1074-1084.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

RIDOM. *Mycobacterium* **alphabetic strain list**. Disponível em: <http://www.ridom-rdna.de/mycobacteria/mycoba_list.htm> Acesso em: 01 nov. 2006.

RINGUET, H. *et al.* *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 852-857, mar. 1999.

ROTH, A. *et al.* Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 139-147, jan. 1998.

ROTH, A. *et al.* Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1094-1104, mar. 2000.

ROY, S. *et al.* Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 530-532, aug. 1997.

ROY, S. *et al.* Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 187-191, 1999.

RUNYON, E. H. Anonymous micobactérias in pulmonary disease. **The Medical Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 273- 290, jan. 1959.

RUSSELL, A. D. Activity of biocides against micobactéria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 87S-101S, 1996.

RUTALA, W. A. *et al.* Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. **The American Journal of Medicine**, v. 91 (suppl 3B), p. 267S-271S, sep. 1991.

SALEM, J. I. *et al.* Isolation and characterization of mycobacteria colonizing the helathy skin. **Acta Leprologia**, v. 7 (suppl. 1), p. 18-20, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3th. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, A. R. **Desenvolvimento de método para extração de ácidos nucléicos de micobactérias e utilização da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para o diagnóstico de hanseníase**. Rio de Janeiro, 1992. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz.

SCHNITZLER, R. Hanseníase. In: AMARO NETO, V.; BALDY, J. L. da. S. 3. ed. rev. e amp. **Doenças transmissíveis**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 451-465.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-381, apr. 2006.

SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; WILLIAMS, D. L. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 109, p. 642-646, 1998.

SHARMA, R. K. *et al.* Isolation and characterization of cultivable mycobacteria from leprosy skin. **Indian Journal of Leprosy**, v. 67, n. 3, p. 321-328, 1995.

SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 112, p. 445-454, 1960.

SHIN, Y. *et al.* Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4535-4538, dec. 2000.

SIDDIQUI, M. R. *et al.* A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nature Genetics**, v. 27, p. 439-441, apr. 2001.

SOINI, H.; BÖTTGER, E. C.; VIJANEN, M. K. Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 2944-2947, dec. 1994.

SOINI, H.; VIJANEN, M. K. Diversity of the 32-kilodalton protein gene may form a basis for species determination of potentially pathogenic mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 769-773, mar. 1997.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 809-814, 2001.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, jul./set. 1997.

SUNG, K. J. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from multibacillary and paucibacillary leprosy patients by polymerase chain reaction. **International Journal of Dermatology**, v. 32, p. 710-713, 1993.

SURZYCKI, S. **Basic techniques in molecular biology**. Springer, 2000.

TAKEWAKI, S. *et al.* Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene species-specific oligonucleotide probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 446-450, feb. 1993.

TAKEWAKI, S. *et al.* Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 159-166, jan. 1994.

TAYLOR, T. B. *et al.* Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of micobactéria growing in liquid media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 79-85, jan. 1997.

TELENTI, A. *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p.175-178, feb. 1993.

TESKE, A; WOLTERS, J.; BÖTTGER, E. C. The 16S rRNA nucleotide sequence of *Mycobacterium leprae*: phylogenetic position and development of DNA probes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15, n. 2-3, p. 231-237, may 1991.

THIBERT, L.; LAPIERRE, S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1759-1763, jul. 1993.

TODD J. R.; WES, B. C.; McDONALD, J. C. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 63-74, jan./feb. 1990.

TOMIMORI-YAMASHITA, J. *et al.* Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 71, n. 4, p. 343-349, jul./ago. 1996.

TOOSSI, Z.; ELLNER, J. J. Tuberculose. In: KELLEY, W. N. **Tratado de Medicina Interna**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 1751-1761.

TORRES, P. *et al.* Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Leprosy Review**, v. 74, n. 1, p. 18-30, 2003.

TOSH, K. *et al.* A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1190-1193, 2002.

TROESCH, A. *et al.* *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 49-55, jun. 1999.

TRUMAN, R. *et al.* Genotypic variation and stability of variable number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2558-2565, jun. 2004.

TURENNE, C. Y. *et al.* Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3637-3648, jan. 2001.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; PUBLIC HEALTH SERVICES; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories. In: FLEMING, D. O. *et al.* **Laboratory safety**: principles and practices. 2nd. ed. Washington: American society for Microbiology, 1995, p. 219-237.

VAN BEERS, S. M.; WIT, M. Y. L. de; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, p. 221-230, 1996.

VAN EDEN, W. *et al.* HLA segregation of tuberculoid leprosy: confirmation of the DR2 marker. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 6, p. 693-701, jun. 1980.

VAN EDEN, W. *et al.* HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 1, p. 9-14, jan. 1985.

VESLEY, D.; LAUER, J. L. Decontamination, sterilization, disinfection and antisepsis. In: FLEMING, D. O. *et al.* **Laboratory safety**: principles and practices. 2nd. ed. Washington: American society for Microbiology, 1995, p. 219-237.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. 1023.1-1023.8, aug. 2001.

VOSSLER, J. L. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculous mycobacteria. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology**. 2nd. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 667-707.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S.; Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, v. 31, n. 5, p. 257-27, 2004.

WILLIAMS, D. L. *et al.* The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, p. 193-200, 1990.

WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P.; PORTAELS, F. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment-length polymorphism analysis. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1653-1659, 1990.

WILLIAMS, D. L. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 401-410, 1992.

WIT, M. Y. L. de *et al.* Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 906-910, may 1991.

WIT, M. Y. L. de *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 502-506, mar. 1993.

WONG, D. *et al.* Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3768-3771, oct. 2001.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, p. 305-310, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory biosafety manual**. 2nd. ed. rev. Geneva : World Health Organization, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation 2005. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 80. n. 34, p. 289-296, aug. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation 2006. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 81. n. 32, p. 309-316, aug. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy**: prevalence rates at end 2005. Disponível em: <<http://who.int/lep/situation/PrateEnd2005v2-WM2.pdf>> Acesso em: 01 nov. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Transmission of leprosy**. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/transmission/en/index.html>> Acesso em: 01 nov. 2006.

YOON, K. *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 895-899, apr. 1993.

ZELAZNY, A. M. Identification of *Mycobacterium* species by *secA1* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1051-1058, mar. 2005.

ZOLG, J. W.; PHILIPPI-SCHULZ, S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2801-2812, nov. 1994.

ANEXOS

ANEXO 1	-	PROTOCOLO PARA RECUPERAÇÃO E CONGELAMENTO DE CEPAS DE <i>Mycobacterium</i>	187
ANEXO 2	-	PROTOCOLO PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA.....	188
ANEXO 3	-	PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DAS LÂMINAS PELO MÉTODO DE ZIEHL-GABBET.....	189
ANEXO 4	-	PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	190
ANEXO 5	-	PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE BIÓPSIAS DE PELE ADAPTADO DE MARTÍNEZ (2005).....	193
ANEXO 6	-	PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO DNA.....	194
ANEXO 7	-	PROTOCOLO PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	195
ANEXO 8	-	DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	197
ANEXO 9	-	PROTOCOLO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SEGUNDO SAMBROOK e RUSSELL (2001), BARKER (2002) e BARTLETT (2003).....	198
ANEXO 10	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TELENTI <i>et al.</i> (1993).....	201
ANEXO 11	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TELENTI <i>et al.</i> (1993).....	202
ANEXO 12	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TAYLOR <i>et al.</i> (1997).....	203
ANEXO 13	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TAYLOR <i>et al.</i> (1997).....	204
ANEXO 14	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR DEVALLOIS, GOH e RASTOGI <i>et al.</i> (1997).....	205
ANEXO 15	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR DEVALLOIS, GOH e RASTOGI <i>et al.</i> (1997).....	206
ANEXO 16	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR BRUNELLO <i>et al.</i> (2001).....	207
ANEXO 17	-	TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III ENTRE O PRESENTE	

	TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR BRUNELLO <i>et al.</i> (2001).....	208
ANEXO 18	- TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> EII DE <i>M. leprae</i> ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999).....	209
ANEXO 19	- TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III <i>M. leprae</i> ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999).....	210
ANEXO 20	- TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Bst</i> UI ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR KIM <i>et al.</i> (2001).....	211
ANEXO 21	- TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>rpoB</i> COM A ENZIMA <i>Hae</i> III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR KIM <i>et al.</i> (2001).....	212
ANEXO 22	- MATRIZ DISJUNTIVA CONSTRUÍDA COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (<i>Hae</i> III, <i>Bst</i> UI, <i>Bst</i> EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES <i>rpoB</i> E <i>hsp65</i> PARA AMOSTRAS CLÍNICAS E CEPAS REFERÊNCIA.....	213

ANEXO 1 – PROTOCOLO PARA RECUPERAÇÃO E CONGELAMENTO DE CEPAS DE *Mycobacterium*

1. Serrar a base da parte superior da ampola com lixa;
2. Quebrar a ampola no lugar serrado, protegendo com gaze embebida em álcool 70%;
3. Verter cerca de 5 ml da solução de glicerol a 10% em tubo cônico de 50 ml. Transferir com pipeta pasteur estéril, lentamente, um pouco da solução de glicerol a 10% para a ampola e homogeneizar para ressuspensão do líofolo. Adicionar mais um pouco de solução de glicerol e transferir o conteúdo para tubo cônico de 15 ml com o auxílio de pipeta pasteur. Enxaguar a ampola com solução de glicerol para remoção de microrganismos aderidos a superfície interna da ampola e transferir o conteúdo para o tubo através da pipeta pasteur;
4. Homogeneizar a suspensão através da agitação em vortex;
5. Transferir, com auxílio de alça esterilizada, a suspensão para seus respectivos tubos de meio Löwenstein-Jensen (LJ) (quatro tubos para cada espécie). Esterilizar a alça no final do processo da semeadura de cada espécie ou sempre que necessário. Para a espécie *Mycobacterium smegmatis* o meio de recuperação foi o ágar *Brain Heart Infusion* BHI (quatro tubos) e caldo BHI (quatro tubos). Transferir três alçadas da suspensão de células em glicerol para cada um dos tubos;
6. Transferir, com auxílio de pipeta pasteur, aproximadamente 1 ml da suspensão restante para flaconetes de criopreservação;
7. Identificar os tubos semeados e os flaconetes com o nome da espécie e data;
8. Colocar os flaconetes a -70°C para conservação de microrganismos;
9. Incubar os tubos inoculados em estufa a 37°C até o desenvolvimento de colônias.

ANEXO 2 – PROTOCOLO PARA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA

1. Transferir cerca de 8 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% para tubo cônico graduado de 15 ml;
2. Com auxílio de pipeta pasteur, transferir a solução salina para o tubo LJ que contém a micobactéria em questão e raspar a superfície do meio com alça esterilizada. Esterilizar a alça sempre que necessário;
3. Transferir o conteúdo do tubo LJ para tubo cônico de 15 ml destinado para coleta de células;
4. Repetir os itens dois e três até remoção das células da superfície do tubo LJ;
5. Para a espécie *M. smegmatis* cultivada em caldo BHI, distribuir o conteúdo dos tubos de cultivo para tubos cônicos de 50 ml;
6. Inativar a suspensão de micobactérias em banho-maria a 80°C por 10 minutos (TELENTI *et al*, 1993);
7. Centrifugar os tubos por 15 minutos a 2.500 g (BELISE; SONNENBERG, 1998);
8. Com auxílio de pipeta pasteur, remover sobrenadante do tubo centrifugado para um tubo cônico de 50 ml de descarte;
9. Transferir, com auxílio de pipeta graduada, cerca de 8 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) para tubo cônico graduado de 15 ml destinados para tal;
10. Com auxílio de pipeta pasteur, transferir uma pequena quantidade de tampão TE para o tubo com o pélete para ressuspendê-lo. Adicionar mais tampão até completar 8 ml;
11. Centrifugar os tubos a 2.500 g por 15 minutos;
12. Com auxílio de pipeta pasteur, remover o sobrenadante do tubo centrifugado para um tubo cônico de 50 ml de descarte;
13. Ressuspende o sedimento e, se necessário, adicionar um pouco de tampão TE apenas para permitir a aspiração e pipetar 50 µl do sedimento para microtubos;
14. Identificar os microtubos com etiquetas contendo o nome da espécie e data;
15. Congelar os microtubos em *freezer* a -20°C.

ANEXO 3 – PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO DAS LÂMINAS PELO MÉTODO DE ZIEHL-GABBET

1. Preparar formol-leite como segue: 0,15 ml de formol a 40%, 1 ml de leite desnatado 0% de gordura e 10 ml de água destilada;
2. Adicionar 10 µl da solução formol-leite em área delimitada de uma lâmina de cerca de 1 cm de diâmetro;
3. Agitar a suspensão contida em microtubo;
4. Adicionar 10 µl da suspensão de células, homogeneizando o material através de movimentos de sucção e ejeção da micropipeta e espalhando o conteúdo em toda a área do círculo;
5. Colocar o material em estufa a 37°C até secar;
6. Após a secagem, proceder a fixação do material em vapores de formol, em câmara saturada fechada (jarra de Coplin, contendo 3 ml de formol a 40%) por 3 minutos;
7. Retirar a lâmina da câmara saturada e colocá-la sobre vapores provenientes de banho-maria, feito como um copo de bquer com água fervente sob tela de amianto e sobre bquer parte de placa de Petri voltada para baixo encaixando na boca do copo de bquer, e sobre placa de Petri, a lâmina escavada, por 2 minutos;
8. Repetir fixação em vapores de formol a 40% por 3 vezes;
9. Após a fixação, proceder a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Gabbet, sendo:
 - ❶ Cobrir a lâmina com fucsina de Ziehl por 25 minutos;
 - ❷ Lavar a lâmina com água destilada;
 - ❸ Cobrir a lâmina com azul de Gabbet por 2 minutos;
 - ❹ Lavar a lâmina com água destilada;
 - ❺ Com auxílio de papel absorvente, limpar e secar a lâmina em estufa a 37°C.
10. Visualizar o material em microscópio óptico com objetiva de imersão 100X.

ANEXO 4 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Protocolo 1 segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989)

1. À um volume de 50 mg a 100 mg de células adicionar 400 µl de tampão TE. Adicionar SDS a 1% (0,5% mínimo) em volume final. Incubar 2 horas a 37°C em presença de 200 µg/ml final de RNase. Adicionar proteinase K (solução a 20 mg/ml), para atingir uma concentração final de 200 µg/ml e incubar de 2 horas a uma noite a 55°C;
2. Adicionar a solução fenol saturado (fase inferior) volume/volume, agitar levemente. Centrifugar 5 minutos, 12.000 g a 20°C, recuperar a fase superior para outro tubo usando ponteira com diâmetro de 3 a 4 mm. Repetir se necessário;
3. Adicionar a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) volume/volume, agitar gentilmente, centrifugar 5 minutos, 12.000 g a 20°C. Recuperar a fase superior para outro tubo usando ponteira com diâmetro de 3 a 4 mm. Repetir se necessário;
4. Adicionar clorofórmio volume/volume, agitar gentilmente, centrifugar 5 minutos, 12.000 g a 20°C. Recuperar a fase superior para outro tubo usando ponteira com diâmetro de 3 a 4 mm. Repetir se necessário;
5. Se o volume obtido é inferior a 700 µl, extrair com dois volumes de etanol; se o volume é superior a 700 µl, extrair com um volume de isopropanol. Adicionar acetato de sódio 3 M para obter 10% no volume final, adicionar 2,5 volumes de etanol (ou um volume de isopropanol), agitar levemente, colocar de 4 horas a uma noite a -20°C (etanol ou isopropanol) ou 1 hora no mínimo a -80°C (somente etanol). Centrifugar 30 minutos, 12.000 g a 4°C, remover o sobrenadante, fazer 2 lavagens do sedimento com etanol a 70% (300 µl por tubo). Ressuspender o sedimento em centrifuga por 15 minutos, 12.000 g a 4°C. Remover o etanol e secar;
6. Ressuspender o DNA em 100 µl de água ultrapura e deixar hidratar por no mínimo uma noite.

Protocolo 2 segundo BELISLE e SONNENBERG (1998)

1. Ressuspender as células em 500 µl de TE;
2. Adicionar igual volume de clorofórmio/metanol (2:1) e agitar em homogeneizador por 5 minutos;
3. Centrifugar a suspensão a 2.500 g por 15 minutos. A bactéria forma uma banda compacta na interface orgânica-aquosa. Remover ambas as camadas, orgânica e aquosa, tendo cuidado para deixar a banda bacteriana fortemente compactada no tubo;
4. Colocar o tubo destampado contendo as células deslipídicas a 55°C por 10-15 minutos para remover traços de solvente orgânicos que podem interferir com a atividade lisosomal;
5. Adicionar 500 µl de TE e suspender as células em agitador vortex vigorosamente;
6. Adicionar 0,1 volume de 1M Tris-HCl, pH 9 para aumentar o pH da suspensão celular;
7. Adicionar lisozima para uma concentração final de 100 µg/ml e incubar a 37°C por 12-16 horas. Não usar vortex para misturar;
8. Adicionar 0,1 volume de SDS 10% e 0,01 volume de solução de proteinase K (10 mg/ml) para lise celular. Misturar por inversão várias vezes e incubar a 55°C por 3 horas. Se nesse ponto a suspensão não é homogênea ou viscosa aumentar a concentração de SDS para 2% e 0,01 volume de proteinase K, misturar e incubar por mais uma hora;
9. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e gentilmente agitar no homogeneizador por 30 minutos seguido de centrifugação a 12.000 g por 30 minutos;
10. Cuidadosamente transferir a camada aquosa (fase superior) para tubo com a ponteira com diâmetro de 3 a 4 mm;
11. Adicionar a fase aquosa igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitar gentilmente por 5 minutos. Centrifugar a 12.000 g por 30 minutos. Transferir a fase superior, com ponteira de diâmetro de 3 a 4 mm, para novo tubo;
12. Adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol (etanol a -20°C). Inverter o tubo lentamente para misturar e colocar a 4°C por 1 hora;

13. Centrifugar a solução a 12.000 g por 30 minutos. Remover o sobrenadante e lavar o DNA com etanol 70% frio (-20°C);
14. Novamente, centrifugar o DNA (12.000 g por 30 minutos a 4°C), removendo etanol e permitir o pélete secar ao ar;
15. Dissolver o DNA em 100 µl TE ou água ultrapura.

ANEXO 5 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE BIÓPSIAS DE PELE
ADAPTADO DE MARTÍNEZ (2005)

1. Descongelar as amostras;
2. Digerir com 300 µg/ml de proteinase K por 12 horas a 60°C;
3. Inativar a proteinase K pelo calor a 95°C por 10 minutos;
4. Adicionar fenol saturado volume a volume, homogenizar o conteúdo por 10 minutos a velocidade lenta e centrifugar a 12.000 g por 5 minutos;
5. Transferir a fase aquosa, com ponteira de diâmetro de 3 a 4 mm, para novo microtubo. Repetir os itens 4 e 5 se necessário;
6. Adicionar fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) volume a volume, homogenizar o conteúdo por 10 minutos a velocidade lenta e, centrifugar a 12.000 g por 5 minutos;
7. Transferir a fase aquosa, com ponteira de diâmetro de 3 a 4 mm, para novo microtubo. Repetir os itens 6 e 7 se necessário;
8. Adicionar dois volumes de etanol absoluto a -20°C e homogeneizar gentilmente por inversão;
9. Deixar precipitar *overnight* em freezer a -20°C;
10. Centrifugar a 12.000 g por 30 minutos a 4°C;
11. Descartar o etanol;
12. Adicionar 300 µl etanol 70% gelado;
13. Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4°C;
14. Desprezar o etanol 70%. Repetir a lavagem com etanol 70% por mais uma vez;
15. Secar o precipitado;
16. Ressuspender em 100 µl de água ultrapura.

ANEXO 6 – PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO DNA

1. Preparar uma diluição do DNA com água ultrapura. Geralmente, uma diluição 1:50 ou 1:100 é adequada. O branco é a água ultrapura;
2. Colocar a amostra em cubeta de quartzo;
3. Realizar a leitura em espectrofotômetro nas absorvâncias de 260 e 280 nm. A concentração de DNA e a razão A_{260}/A_{280} são fornecidos automaticamente pelo aparelho.

ANEXO 7 – PROTOCOLO PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Montagem do aparato de eletroforese:

1. Em bancada, colocar a cuba de eletroforese contendo suporte para verter o gel, pentes e dispositivo delimitador de suporte, fonte de energia e fios de corrente;
2. Conectar os fios de corrente a fonte;
3. Colocar os dispositivos delimitadores da bandeja;
4. Colocar o pente.

Preparo do gel de agarose:

1. Para detecção de DNA genômico utilizar agarose a 0,8% e para detecção de produtos de PCR utilizar agarose a 1,6%. A cuba para eletroforese empregada comporta um volume de 30 ml de solução e para preparar um gel de 0,8%, deve-se pesar 0,24 g de agarose e para preparar um gel 1,6 %, deve-se pesar 0,48 g de agarose;
2. Medir em proveta 30 ml de TAE 1X;
3. Transferir a agarose para erlenmeyer e verter o conteúdo da proveta para o erlenmeyer;
4. Agitar a mistura e dissolver em microondas até fusão da agarose.

Preparo da cuba de eletroforese com o gel de agarose e corrida:

1. Deixar esfriar a solução de agarose até 55°C;
2. Deixar a solução solidificar;
3. Colocar o tampão de eletroforese apenas o suficiente para cobrir o gel;
4. Remover o pente;
5. Sobre um pedaço de parafilme, misturar as amostras como 0,2 volumes de tampão de amostra;
6. Aplicar a mistura para dentro da canaleta;
7. Após aplicação das amostras, fechar a tampa da cuba e conectar a ela os fios de corrente;

8. Ligar a fonte na voltagem desejada, neste caso 60 V. O DNA irá migrar para o pólo positivo (ânodo), indicado pela cor vermelha.

Coloração de DNA em gel de agarose:

1. Colocar o gel em recipiente contendo brometo de etídio a 0,5 µg/ml em suficiente quantidade para cobrir o gel por 20 minutos em temperatura ambiente;
2. Transferir o gel para recipiente contendo água destilada por aproximadamente 2 minutos;
3. Visualizar o gel sob luz ultravioleta;
4. Fotografar o gel.

ANEXO 8 – DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

1. Preparar a mistura de reação (ver item 4.8);
2. Adicionar 10 µl do produto de PCR ao tubo contendo o *mix*;
3. Agitar para homogeneizar;
4. Incubar todos os tubos, em estufa, na temperatura recomendada pelo fabricante (ver tabela 32);
5. Deixar em estufa por 12 a 24 horas;
6. Após a digestão armazenar os tubos a 4°C até o momento da eletroforese.

TABELA 32 – TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS

ENZIMA DE RESTRIÇÃO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO
<i>Hae</i> III (Invitrogen)	37°C
<i>Bst</i> EII (Fermentas)	37°C
<i>Bst</i> UI (New England BioLabs)	60°C

ANEXO 9 – PROTOCOLO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
SEGUNDO SAMBROOK e RUSSELL (2001), BARKER (2002) e
BARTLETT (2003)

Montagem do aparato e preparo do gel:

1. Lavar as placas de vidro e espaçadores com água morna e detergente, usando uma escova macia ou um pano que não arranhe o vidro. Enxaguar bem em água de torneira, após enxaguar com álcool e por último em água destilada. Segurar as placas pela margem ou usar luvas, para não depositar gordura das mãos na superfície das placas. Secar em estufa ou com papel-toalha e remover qualquer vestígio de umidade com lenços de papel fino;

2. Montagem das placas de vidro com espaçadores:

❶ Colocar a placa maior (não chanfrada) sobre uma folha de papel-toalha, a qual está sobre a bancada;

❷ Aplicar silicone nas margens laterais e do fundo, o suficiente para manter fixos os espaçadores;

❸ Colocar os espaçadores em cada lado paralelos as margens e no fundo;

❹ Colocar a placa menor (chanfrada) sobre a placa maior, apoiando-a sobre os espaçadores;

❺ Prender as placas com grampos. Vedar as laterais e o fundo do conjunto com perfil de silicone. Existem muitos tipos de aparelhos para eletroforese disponíveis comercialmente, e o arranjo das placas e espaçadores difere de fabricante para fabricante. Seja qual for o modelo, o objetivo é ter uma vedação entre as placas e os espaçadores de modo que a solução de gel não polimerizada não vaze.

3. Considerar o tamanho das placas de vidro e espessura dos espaçadores para calcular o volume de gel a ser preparado. Foram preparados 20 ml de géis a 8% e 10% de poliacrilamida e os volumes utilizados dos componentes do gel estão na tabela 33.

TABELA 33 – VOLUME DE REAGENTES USADOS PARA O PREPARO DE GEL DE POLIACRILAMIDA

GEL DE POLIACRILAMIDA (%)	ACRILAMIDA:BIS 40 % (ml)	ÁGUA ULTRAPURA (ml)	TBE 5X (ml)	PERSULFATO DE AMÔNIO 10% (μl)
8	4	12	4	100
10	5	11	4	100

Moldagem do gel:

1. Misturar os componentes na ordem: acrilamida:bis, água, tampão e persulfato de amônio;
2. Adicionar 50 μl de TEMED para cada 100 ml de solução de acrilamida:bis. Misturar gentilmente e despejar o gel, rapidamente, no espaço entre as duas placas, cuidando para não formar bolhas. Se bolhas são formadas, interromper a adição da solução, inclinar levemente o conjunto das duas placas e voltar o mesmo para a posição normal;
3. Inserir o pente, cuidando para não formarem bolhas embaixo dos dentes. Se necessário, adicionar mais solução do gel para preencher completamente o espaço entre as duas placas;
4. Deixar a solução acrilamida:bis polimerizar por 30 a 60 minutos em temperatura ambiente, adicionando mais solução do gel se o mesmo retrair;
5. Após a polimerização, remover o pente com auxílio de uma espátula;
6. Lavar os poços com TBE 1X com auxílio de seringa e agulha;
7. Remover o perfil de silicone e o espaçador do fundo.

Carregamento do gel e corrida:

1. Fixar o conjunto no suporte da cuba, usando grampos. A placa chanfrada deve ser voltada para dentro da cuba;
2. Preencher os reservatórios da cuba com TBE 1X;
3. Remover bolhas no topo e no fundo do gel com auxílio de seringa e agulha;
4. Adicionar a cada microtubo com amostra 5 μl de tampão de amostra, misturar e carregar o gel usando uma micropipeta equipada com ponteira alongada. Para

preparar o padrão de peso molecular, misturar 1 μg de DNA, 4 μl de água ultrapura e 5 μl do tampão de amostra e aplicar a mistura no gel;

5. Conectar os fios de corrente a fonte, ligar a fonte e iniciar a corrida com voltagem em 60 V (1-8 V/cm);

6. Correr o gel até o marcador de azul de bromofenol ter percorrido a distância desejada. Desligar a fonte, desconectar os fios de corrente e descartar o tampão de eletroforese dos reservatórios;

7. Desunir as placas de vidro, com auxílio de espátula e jatos de água destilada aplicados entre as mesmas. Remover a placa superior, com cuidado, retirar os espaçadores e destacar o gel preso à outra placa usando jatos de água.

Coloração de DNA em gel de poliacrilamida:

1. Colocar o gel, com muito cuidado, em recipiente contendo brometo de etídio a 0,5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ em suficiente quantidade para cobrir o gel por aproximadamente 5 minutos em temperatura ambiente;

2. Transferir o gel, com muito cuidado, para recipiente contendo água destilada por aproximadamente 2 minutos;

3. Visualizar o gel sob luz ultravioleta;

4. Fotografar o gel.

ANEXO 10 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TELENTI *et al.* (1993)

OBSERVADO		TELENTI <i>et al.</i> (1993)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	230, 112, 87	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	245, 125, 80
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	230, 192	-	-
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	230, 125, 87	<i>M. smegmatis</i> (IP 14133.0001)	245, 140, 85
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	224, 190	<i>M. avium</i> (Borstel)	245, 220
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	242, 113, 88	<i>M. gordonae</i> (IP 14034.0001, ATCC 14470)	245, 125, 80 (<i>M. gordonae</i> I, II)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	230, 192	<i>M. kansasii</i> (NCTC 10268, IP 14011.0001, DSM 43224)	245, 220
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	338, 126	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	Não digeriu	<i>M. szulgai</i> (Borstel, IP 14024.0001)	Não digeriu
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	332, 111	<i>M. terrae</i> (DSM 10111.68)	325, 125
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	230, 112, 87	<i>M. bovis</i> (IP 14002.0001)	245, 125, 80 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	230, 114, 88	<i>M. tuberculosis</i> (IP 14001.0001)	245, 125, 80 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 11 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TELENTI *et al.* (1993)

OBSERVADO		TELENTI <i>et al.</i> (1993)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	135, 116, 59, 52	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	155, 135
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	129, 80, 59, 51	-	-
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	131, 114, 58	<i>M. smegmatis</i> (IP 14133.0001)	160, 130
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	119, 99	<i>M. avium</i> (Borstel)	140, 105
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	147, 107, 59	<i>M. gordonae</i> (IP 14034.0001, ATCC 14470)	170, 115 (<i>M. gordonae</i> I)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	119, 99, 78	<i>M. kansasii</i> (NCTC 10268, IP 14011.0001, DSM 43224)	140, 105, 70
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	274, 121	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	120, 99, 70	<i>M. szulgai</i> (Borstel, IP 14024.0001)	140, 105
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	160, 119	<i>M. terrae</i> (DSM 10111.68)	190, 140
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	140, 120, 70	<i>M. bovis</i> (IP 14002.0001)	160, 140, 70 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	142, 121, 70	<i>M. tuberculosis</i> (IP 14001.0001)	160, 140, 70 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 12 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TAYLOR *et al.* (1997)

OBSERVADO		TAYLOR <i>et al.</i> (1997)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	230, 112, 87	<i>M. fortuitum</i> (urina)	245, 115, 80
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	230, 192	-	-
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	230, 125, 87	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	245, 140, 80
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	224, 190	<i>M. avium-intracellulare</i> (CAP E7-93)	245, 220 (<i>M. avium</i>)
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	242, 113, 88	<i>M. gordonae</i> I (CAP E7-92, E-93)	245, 115, 80
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	230, 192	<i>M. kansasii</i> (CAP E10-92, E1-93)	245, 220
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	338, 126	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	Não digeriu	<i>M. szulgai</i> (CAP E9-92, E2-93)	Não digeriu
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	332, 111	<i>M. terrae</i> (ATCC1 15755)	325, 115
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	230, 112, 87	-	-
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	230, 114, 88	<i>M. tuberculosis</i> (CAP E5-93, E8-93, E11-93)	245, 115, 80 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 13 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR TAYLOR *et al.* (1997)

OBSERVADO		TAYLOR <i>et al.</i> (1997)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	135, 116, 59, 52	<i>M. fortuitum</i> (urina)	155, 135
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	129, 80, 59, 51	-	-
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	131, 114, 58	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	160, 135, 60
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	119, 99	<i>M. avium-intracellulare</i> (CAP E7-93)	140, 105 (<i>M. avium</i>)
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	147, 107, 59	<i>M. gordonae</i> I (CAP E7-92, E-93)	170, 115, 60
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	119, 99, 78	<i>M. kansasii</i> (CAP E10-92, E1-93)	140, 105, 80
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	274, 121	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	120, 99, 70	<i>M. szulgai</i> (CAP E9-92, E2-93)	140, 105, 70
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	160, 119	<i>M. terrae</i> (ATCC1 15755)	190, 140
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	140, 120, 70	-	-
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	142, 121, 70	<i>M. tuberculosis</i> (CAP E5-93, E8-93, E11-93)	160, 140, 70 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 14 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR DEVALLOIS, GOH e RASTOGI *et al.* (1997)

OBSERVADO		DEVALLOIS, GOH e RASTOGI (1997)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	230, 112, 87	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	245, 120, 80 (<i>M. fortuitum</i> I, II)
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	230, 192	<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	245, 220
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	230, 125, 87	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	245, 140, 80
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	224, 190	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	245, 220
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	242, 113, 88	<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	245, 120, 80 (<i>M. gordonae</i> I, II)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	230, 192	<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	245, 220 (<i>M. kansasii</i> I)
<i>M. leprae</i> (Thau-53)	338, 126	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	Não digeriu	<i>M. szulgai</i> (NCTC 1081)	Não digeriu
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	332, 111	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	325, 120
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	230, 112, 87	<i>M. bovis</i> BCG (CIPT 140040001)	245, 120, 80 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	230, 114, 88	<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294, ATCC 25177, CIPT 140010059)	245, 120, 80 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 15 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR DEVALLOIS, GOH e RASTOGI *et al.* (1997)

OBSERVADO		DEVALLOIS, GOH e RASTOGI (1997)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	135, 116, 59, 52	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	155, 135 (<i>M. fortuitum</i> I)
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	129, 80, 59, 51	<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	150, 80
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	131, 114, 58	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	160, 135, 60
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	119, 99	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	140, 105
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	147, 107, 59	<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	170, 115, 60 (<i>M. gordonae</i> I)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	119, 99, 78	<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	140, 105, 80 (<i>M. kansasii</i> I)
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	274, 121	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	120, 99, 70	<i>M. szulgai</i> (NCTC 1081)	140, 105, 70
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	160, 119	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	190, 140
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	140, 120, 70	<i>M. bovis</i> BCG (CIPT 140040001)	160, 140, 70 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	142, 121, 70	<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294, ATCC 25177, CIPT 140010059)	160, 140, 70 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 16 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR BRUNELLO *et al.* (2001)

OBSERVADO		BRUNELLO <i>et al.</i> (2001)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	230, 112, 87	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 19542, MFO1, MFO2, MFO3, MFO4)	234± 3, 131± 5, 85± 3 (<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>)
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	230, 192	<i>M. phlei</i> (OCF878)	234± 3, 211± 4
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	230, 125, 87	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	234± 3, 131± 5, 85± 3
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	224, 190	<i>M. avium</i> (ATCC 15769)	234± 3, 211± 4 (<i>M. avium-parat.</i>)
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	242, 113, 88	<i>M. gordonae</i> I (MGI1, MGI2, MGI3, MGI4, MGI5)	234± 3, 117± 2, 84± 5 (<i>M. gordonae</i> I, II)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	230, 192	<i>M. kansasii</i> (MKA1, MKA2, MKA3, OCF921)	234± 3, 211± 4 (<i>M. kansasii</i> I)
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	338, 126	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	Não digeriu	<i>M. szulgai</i> (OCF 891)	Não digeriu
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	332, 111	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755, MTE1, OCF895)	313± 10, 117± 3
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	230, 112, 87	<i>M. bovis</i> BCG (ATCC 27291)	234± 3, 117± 2, 84± 5 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	230, 114, 88	Complexo <i>M. tuberculosis</i> (OCM1, OCM2, OCM3)	234± 3, 117± 2, 84± 5 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 17 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR BRUNELLO *et al.* (2001)

OBSERVADO		BRUNELLO <i>et al.</i> (2001)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	135, 116, 59, 52	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 19542, MFO1, MFO2, MFO3, MFO4)	137, 117, 58 ou 133, 104, 73 (<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>)
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	129, 80, 59, 51	<i>M. phlei</i> (OCF878)	141, 85, 51
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	131, 114, 58	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	154, 129, 63
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	119, 99	<i>M. avium</i> (ATCC 15769)	127, 104, 51 (<i>M. avium-parat.</i>)
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	147, 107, 59	<i>M. gordonae</i> I (MGI1 a MGI5)	158, 111, 54 (<i>M. gordonae</i> I)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	119, 99, 78	<i>M. kansasii</i> (MKA1, MKA2, MKA3, OCF921)	128, 105, 82 (<i>M. kansasii</i> I)
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	274, 121	-	-
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	120, 99, 70	<i>M. szulgai</i> (OC 891)	131, 106, 75
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	160, 119	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755, MTE1, OCF895)	187, 132
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	140, 120, 70	<i>M. bovis</i> BCG (ATCC 27291)	157, 131, 71 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	142, 121, 70	Complexo <i>M. tuberculosis</i> (OCM1, OCM2, OCM3)	157, 131, 71 (complexo <i>M. tuberculosis</i>)

ANEXO 18 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Bst* EII DE *M. leprae*
ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999)

OBSERVADO		RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	338, 126	<i>M. leprae</i> (tatu e camundongo <i>nude</i>)	315, 135

ANEXO 19 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* COM A ENZIMA *Hae* III *M. leprae*
ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999)

OBSERVADO		RASTOGI, GOH e BERCHEL (1999)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		Substrato da eletroforese: gel de agarose 3%	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 60 pb
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	274, 121	<i>M. leprae</i> (tatu e camundongo <i>nude</i>)	265, 130

ANEXO 20 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Bst* UI ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR KIM *et al.* (2001)

OBSERVADO		KIM <i>et al.</i> (2001)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		O tamanho dos fragmentos foi determinado da seqüência	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	193, 87	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	207, 55
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	189, 78	<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	198, 68
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	229, 67	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	231, 55
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	199, 87	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	216, 79
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	176, 87, 78	<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	180, 79, 74
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	Não digeriu	<i>M. kansasii</i> I (ATCC 12478)	342
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	191, 78, 72	<i>M. leprae</i> (Thai-53)	210, 68, 64
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	173, 88, 79	<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	180, 79, 74
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	174, 94, 79	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	180, 88, 74
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	139, 95, 78	<i>M. bovis</i> (ATCC 19210)	142, 94, 68
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	139, 94, 78	<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	142, 94, 68

ANEXO 21 – TABELA COMPARATIVA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO GENE *rpoB* COM A ENZIMA *Hae* III ENTRE O PRESENTE TRABALHO E OS DADOS PUBLICADOS POR KIM *et al.* (2001)

OBSERVADO		KIM <i>et al.</i> (2001)	
Substrato da eletroforese: gel de poliacrilamida 10%		O tamanho dos fragmentos foi determinado da seqüência	
Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb) – até 50 pb	Cepa	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC 6841)	192, 71	<i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	201, 61, 50
<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	189, 71	<i>M. phlei</i> (ATCC 11758)	201, 61, 50
<i>M. smegmatis</i> (ATCC 607)	189, 71	<i>M. smegmatis</i> (ATCC 19420)	201, 61, 50
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	141, 121	<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	146, 117, 54
<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	119, 112, 70	<i>M. gordonae</i> (ATCC 14470)	117, 114, 79
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	227, 69	<i>M. kansasii</i> I (ATCC 12478)	229, 79
<i>M. leprae</i> (Thai-53)	227, 71	<i>M. leprae</i> (Thai-53)	229, 80
<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	145, 113	<i>M. szulgai</i> (ATCC 35799)	149, 114, 54
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	139, 119	<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	145, 117, 80
<i>M. bovis</i> (BCG-MORAEU)	146, 114, 70	<i>M. bovis</i> (ATCC 19210)	149, 114, 79
<i>M. tuberculosis</i> (isolado clínico)	145, 114, 70	<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	149, 114, 79

ANEXO 22 – MATRIZ DISJUNTIVA CONSTRUÍDA COM OS DADOS OBTIDOS DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA RFLP, COM TRÊS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (*Hae* III, *Bst* UI, *Bst* EII), AOS FRAGMENTOS DE DNA RESULTANTES DA PCR COM OS INICIADORES PARA OS GENES *rpoB* E *hsp65* PARA AMOSTRAS CLÍNICAS E CEPAS REFERÊNCIA

<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>M. phlei</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
<i>M. smegmatis</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>M. avium</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>M. leprae</i>	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
<i>M. szulgai</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>M. terrae</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>M. bovis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
CPPI 1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
CPPI a	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 5	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 6	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 7	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 8	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 9	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 10	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 14	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 18	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 20	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 21	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
CPPI 23	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<i>M. sp</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Tatu	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0